

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成17年6月9日(2005.6.9)

【公表番号】特表2005-503756(P2005-503756A)

【公表日】平成17年2月10日(2005.2.10)

【年通号数】公開・登録公報2005-006

【出願番号】特願2002-555211(P2002-555211)

【国際特許分類第7版】

C 1 2 N 15/09  
 A 6 1 K 31/353  
 A 6 1 K 31/42  
 A 6 1 K 31/4709  
 A 6 1 K 31/522  
 A 6 1 K 31/5575  
 A 6 1 K 31/616  
 A 6 1 K 31/675  
 A 6 1 K 31/7072  
 A 6 1 K 31/711  
 A 6 1 K 31/727  
 A 6 1 K 31/728  
 A 6 1 K 38/00  
 A 6 1 K 39/395  
 A 6 1 K 51/00  
 A 6 1 P 7/02  
 A 6 1 P 9/10  
 A 6 1 P 29/00  
 A 6 1 P 35/00  
 A 6 1 P 35/02  
 A 6 1 P 35/04  
 A 6 1 P 37/02  
 C 0 7 K 14/47  
 C 0 7 K 16/18

【F I】

C 1 2 N 15/00 A  
 A 6 1 K 31/353  
 A 6 1 K 31/42  
 A 6 1 K 31/4709  
 A 6 1 K 31/522  
 A 6 1 K 31/5575  
 A 6 1 K 31/616  
 A 6 1 K 31/675  
 A 6 1 K 31/7072  
 A 6 1 K 31/711  
 A 6 1 K 31/727  
 A 6 1 K 31/728  
 A 6 1 K 39/395 C  
 A 6 1 K 39/395 L  
 A 6 1 P 7/02  
 A 6 1 P 9/10

A 6 1 P 29/00  
 A 6 1 P 35/00  
 A 6 1 P 35/02  
 A 6 1 P 35/04  
 A 6 1 P 37/02  
 C 0 7 K 14/47 Z N A  
 C 0 7 K 16/18  
 A 6 1 K 43/00  
 A 6 1 K 37/02

## 【手続補正書】

【提出日】平成15年8月28日(2003.8.28)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

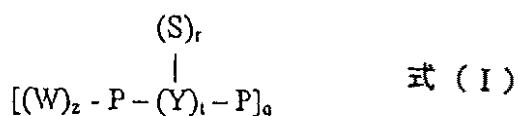
【補正の内容】

【発明の名称】硫酸化部分を含むエピトープを含む単離分子、当該エピトープに対する抗体、及びその使用

【特許請求の範囲】

【請求項1】以下の式：

【化1】



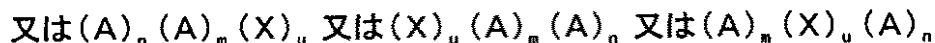
(式中、

Wは、アスパラギン酸とグルタミン酸とを除く任意のアミノ酸であり、

Yは、硫酸化可能な任意の天然部分であり、

Pは、

【化2】



であり、

Sは、スルフェート又は硫酸化分子であり、

Xは、任意のアミノ酸であり、但しアスパラギン酸、グルタミン酸又はチロシンを除く

Aは、任意の負荷電アミノ酸、もしくはロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、セリン又はグリシンであり、

qは、1~6であり、

zは、0、1又は2であり、  
 rは、0又は1であり、  
 tは、1、2又は3であり、  
 uは、0～2であり、  
 nは、0～3であり、  
 mは、0～3

であり、ここで、n=0ならばm>0; m=0ならばn>0; q=1ならばr=1であり、またq>1ならば1以上のYが硫酸化している; さらに、単離エピートープには抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体であって、SEQ ID NO:8又はSEQ ID NO:20を含む第1超可変領域をもつ抗体、断片又は複合体が結合しうる。) )

を含む単離エピートープ。

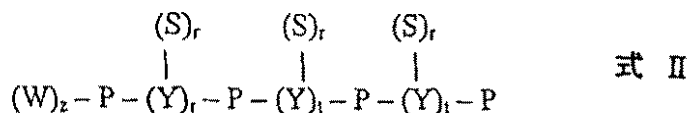
【請求項2】 硫酸化部分がペプチドコンジュゲート又はグリココンジュゲート又はリポコンジュゲートである、請求項1の単離エピートープ。

【請求項3】 Wがグリシンであり、Yがチロシンのペプチドコンジュゲートもしくはアスパラギン、セリン又はトレオニンのグリココンジュゲートであり、Aがグルタミン酸、カルボキシグルタミン酸又はアスパラギン酸であり、qが1、2又は3である、請求項1の単離エピートープ。

【請求項4】 Yがチロシンのペプチドコンジュゲートであり、qが3であり、rが1である、請求項3の単離エピートープ。

【請求項5】 以下の式:

【化3】



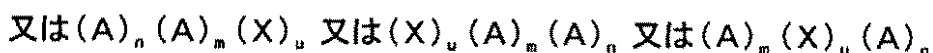
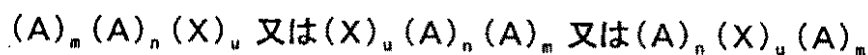
(式中、

Wは、アスパラギン酸とグルタミン酸とを除く任意のアミノ酸であり、

Yは、硫酸化可能な任意の天然部分であり、

Pは、

【化4】



であり、

Sは、スルフェート又は硫酸化分子であり、

Xは、任意のアミノ酸であり、但し、アスパラギン酸、グルタミン酸又はチロシンを除く、

Aは、任意の負荷電アミノ酸、もしくはロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、セリン又はグリシンであり、

zは、0、1又は2であり、

rは、0又は1であり、  
 tは、1、2又は3であり、  
 uは、0～2であり、  
 nは、0～3であり、  
 mは、0～3

であるが、ここでn=0ならばm>0; m=0ならばn>0である; 1以上のYが硫酸化している; さらに、単離エピトープにはSEQ ID NO:8又はSEQ ID NO:20を含む第1超可変領域をもつ抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体が結合しうる。) )

を含む単離エピトープ。

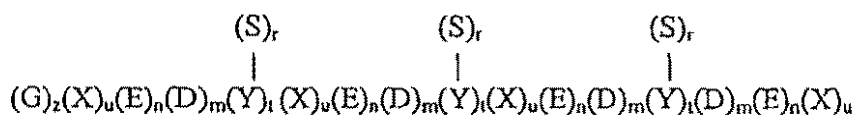
【請求項6】 硫酸化部分がペプチドコンジュゲート又はグリココンジュゲート又はリポコンジュゲートである、請求項5の単離エピトープ。

【請求項7】 Wがグリシンであり、Yがチロシンのペプチドコンジュゲートもしくはアスパラギン、セリン又はトレオニンのグリココンジュゲートであり、Aがグルタミン酸、カルボキシグルタミン酸又はアスパラギン酸、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、セリン又はグリシンである、請求項5の単離エピトープ。

【請求項8】 Yがチロシンのペプチドコンジュゲートであり、qが3であり、rが1である、請求項7の単離エピトープ。

【請求項9】 以下の式:

【化5】



式 III

(式中、

Gは、グリシンであり、  
 Eは、グルタミン酸であり、  
 Dは、アスパラギン酸であり、  
 Yは、チロシンであり、  
 Sは、スルフェート又は硫酸分子であり、  
 Xは、前記以外の任意のアミノ酸であり、  
 zは、0、1又は2であり、  
 tは、1、2又は3であり、  
 rは、0又は1であり、  
 uは、0～2であり、  
 nは、0～3であり、  
 mは、0～3

であるが、ここで、1以上のYが硫酸化している; n=0ならばm>0; m=0ならばn>0;さらに、単離エピトープにはSEQ ID NO:8又はSEQ ID NO:20を含む第1超可変領域をもつ抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体が結合しうる。) )

【請求項10】 rが1である、請求項9の単離エピトープ。

【請求項11】 硫酸化Yでありうる天然部分が脂質、糖質、ペプチド、糖脂質、糖タンパク質、リポタンパク質、及び/又はリポ多糖分子を含む、請求項1～8のいずれか1項の単離エピトープ。

【請求項12】 請求項1～10のいずれか1項の単離エピトープの同族体又は模倣体。

【請求項13】 硫酸化に加えて1以上の翻訳後修飾を含む、請求項1～10のいずれか1項の単離エピトープ。

【請求項14】 請求項1～10のいずれか1項の単離エピトープを含む組成物。

【請求項15】 エピトープの結合能を改善することができる上流又は下流領域をさらに含む、請求項14の組成物。

【請求項16】 上流又は下流領域がエピトープに隣接する、請求項15の組成物。

【請求項17】 請求項1～10のいずれか1項の単離エピトープの少なくとも一部分をコードする単離ヌクレオチド。

【請求項18】 請求項1の単離エピトープと結合又は交差反応しうる抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項19】 請求項5の単離エピトープと結合又は交差反応しうる抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項20】 請求項9の単離エピトープと結合又は交差反応しうる抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項21】 請求項2～4、6～8又は10～13のいずれか1項の単離エピトープと結合又は交差反応しうる抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項22】 請求項1～13のいずれか1項の単離エピトープと結合又は交差反応しうる抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を生産する方法であって、

(a) ファージ・ディスプレイ・ライブラリーを準備する；

(b) 請求項1～13のいずれか1項の単離エピトープを準備する；

(c) ファージ・ディスプレイ・ライブラリーをパニングして、該単離エピトープと結合しうるオリゴペプチド又はポリペプチドを提示するファージ粒子を選び出す；及び

(d) 該単離エピトープと結合しうる該オリゴペプチド又はポリペプチドを含む抗体、その結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を生産するステップを含む方法。

【請求項23】 SEQ ID NO:25又はSEQ ID NO:203のscFv抗体断片の結合能を有する抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項24】 SEQ ID NO:8又はSEQ ID NO:20を含む第1超可変領域をもつことを特徴とするペプチド又はポリペプチドの結合能を有する抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項25】 ペプチド又はポリペプチドがSEQ ID NO:115を含む第2超可変領域及び/又はSEQ ID NO:114を含む第3超可変領域をもつことをさらなる特徴とする、請求項23～24のいずれか1項の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項26】 2以上の酸性アミノ酸と1以上の硫酸化チロシンとを含むおよそ3～126アミノ酸残基の長さのペプチドエピトープ又はポリペプチドエピトープに結合しうる抗体、抗体結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項27】 エピトープがさらにプロリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、グリシン又はフェニルアラニン残基を含むことを特徴とする、請求項26の抗体、抗体結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項28】 抗体又はその抗原結合性断片がさらに糖質、ペプチド、糖脂質、糖タンパク質、リポタンパク質及び/又はリポ多糖分子上のエピトープに結合しうることを特徴とする、請求項23～27のいずれか1項の抗体、抗体結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項29】 糖質、ペプチド、糖脂質、糖タンパク質、リポタンパク質及び/又はリポ多糖分子上のエピトープが1以上の硫酸化部分を含むことをさらなる特徴とする、請求項28の抗体、抗体結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項30】 PSGL-1、フィブリノゲン、GPIb、ヘパリン、ルミカン、補体複合

体4(CC4)、インター インヒビター及びプロトロンピンからなる群より選択される2以上の異なる分子に結合しうる抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項31】 PSGL-1、フィブリノゲン<sup>1</sup>、GPIb、ヘパリン、ルミカン、補体複合体4(CC4)、インター インヒビター及びプロトロンピンからなる群より選択される2以上の異なる分子に結合し、かつB-CLL細胞、AML細胞、多発性骨髄腫細胞及び転移性細胞からなる群より選択される1以上の細胞型にも結合しうる抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項32】 PSGL-1、フィブリノゲン<sup>1</sup>、GPIb及びヘパリンの各々に結合しうる、請求項31の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項33】 PSGL-1、フィブリノゲン<sup>1</sup>、GPIb及びヘパリンの各々に結合し、かつB-CLL細胞、AML細胞、多発性骨髄腫細胞及び転移性細胞からなる群より選択される1以上の細胞型にも結合しうる、請求項32の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項34】 PSGL-1、フィブリノゲン<sup>1</sup>、GPIb、ヘパリン、ルミカン、補体複合体4(CC4)、インター インヒビター及びプロトロンピンからなる群より選択される2以上の異なる分子に結合し、かつさらに脂質、糖質、ペプチド、糖脂質、糖タンパク質、リポタンパク質及び/又はリポ多糖分子上のエピトープにも結合しうる抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項35】 脂質、糖質、ペプチド、糖脂質、糖タンパク質、リポタンパク質及び/又はリポ多糖分子上のエピトープが1以上の硫酸化部分を含むことを特徴とする、請求項34の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項36】 2以上のエピトープすなわち各々1つ又は複数の硫酸化チロシン残基と2以上の酸性アミノ酸からなる1以上のクラスターとを含む2以上のエピトープと交差反応しうる抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項37】 PSGL-1と交差反応しうる、請求項36の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項38】 1以上の硫酸化チロシン残基を含むQATEYEYLDY DFLPETEに結合する、請求項37の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項39】 GB1b- と交差反応しうる、請求項36の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項40】 1以上の硫酸化チロシン残基を含むDEGDTDLY DYPEEDTEGDに結合する、請求項36の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項41】 1以上の硫酸化チロシン残基を含むTDLYDYYP EEEDTEに結合する、請求項39の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項42】 1以上の硫酸化チロシン残基を含むGDEGDTD LYDYYPに結合する、請求項39の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項43】 1以上の硫酸化チロシン残基を含むYDYYPEEに結合する、請求項39の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項44】 1以上の硫酸化チロシン残基を含むTDLYDYYPに結合する、請求項39の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項45】 フィブリノゲン<sup>1</sup>と交差反応しうる、請求項36の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項46】 1以上の硫酸化チロシン残基を含むEPHAETE YDSLYPEEDに結合する、請求項45の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項47】 ヘパリンと交差反応しうる、請求項36の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項48】 補体複合体4(CC4)と交差反応しうる、請求項36の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項49】 1以上の硫酸化チロシン残基を含むMEANEDYED YEYDELPAKに結合する、請求項48の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項50】 B-CLL細胞、AML細胞、多発性骨髄腫細胞及び転移性細胞からなる群より選択される1以上の細胞型と交差反応しうる、請求項36の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項51】 細胞ローリングを阻害しうる請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項52】 炎症を阻害しうる請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項53】 自己免疫疾患を阻害しうる請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項54】 血栓症を阻害しうる請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項55】 再狭窄を阻害しうる請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項56】 転移を阻害しうる請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項57】 腫瘍細胞の成長及び/又は複製を阻害しうる請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項58】 腫瘍細胞の死亡率を高めうる請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項59】 白血病細胞の成長及び/又は複製を阻害しうる請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項60】 白血病細胞の死亡率を高めうる請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項61】 抗疾病薬による傷害への病変細胞の感受性を増進しうる請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項62】 抗がん薬による傷害への腫瘍細胞の感受性を増進しうる請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項63】 抗白血病薬による傷害への白血病の感受性を増進しうる請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項64】 腫瘍患者の腫瘍細胞数の増加を阻害しうる請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項65】 がん患者の腫瘍細胞数を減少させうる請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項66】 白血病患者の白血球細胞数の増加を阻害しうる請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項67】 白血病患者の白血球細胞数を減少させうる請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項68】 細胞-細胞、細胞-マトリックス、血小板-マトリックス、血小板-血小板及び/又は細胞-血小板間の複合体形成を阻害しうる請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項69】 細胞-細胞、細胞-マトリックス、血小板-マトリックス、血小板-血小板及び/又は細胞-血小板間の接着を阻害しうる請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項70】 細胞-細胞、細胞-マトリックス、血小板-マトリックス、血小板-血小板及び/又は細胞-血小板間の凝集を阻害しうる請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項71】 抗がん薬、抗転移薬、抗白血病薬、抗疾病薬、抗接着薬、抗血栓薬、抗再狭窄薬、抗自己免疫薬、抗凝集薬、抗菌薬、抗ウイルス薬及び抗炎症薬からなる群より選択される薬剤と複合又は結合した請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項72】 薬剤がアシクロビル、ガンシクロビル及びジドブジンからなる群より選択される抗ウイルス薬であることを特徴とする、請求項71に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項73】 薬剤がシロスタゾール、ダルテパリンナトリウム、レビパリンナトリウム及びアスピリンからなる群より選択される抗血栓/再狭窄薬であることを特徴とする、請求項71に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項74】 薬剤がザルトプロフェン、プラノプロフェン、ドロキシカム、acetyl salicylic 17、ジクロフェナク、イブプロフェン、デキシブプロフェン、スリダク、ナプロキセン、アムトルメチン、セレコキシブ、インドメタシン、ロフェコキシブ及びニメスリドからなる群より選択される抗炎症薬であることを特徴とする、請求項71に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項75】 薬剤がレフルノマイド、デニロイキンジフチトクス(denileukin diftiox)、スブロイム(subreum)、WinRho SDF、デフィプロチド及びシクロホスファミドからなる群より選択される抗自己免疫薬であることを特徴とする、請求項71に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項76】 薬剤がリマプロスト、クロルクロメン及びヒアルロン酸からなる群より選択される抗接着/抗凝集薬であることを特徴とする、請求項71に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項77】 薬剤が毒素、放射性同位体及び治療薬からなる群より選択されることを特徴とする、請求項71に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項78】 毒素がgelonin、Pseudomonas外毒素(PE)、PE40、PE38、リシン(ricin)、及びそれらの修飾体、誘導体からなる群より選択されることを特徴とする、請求項77に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項79】 放射性同位体が 放出体、陽電子放出核、X線放出体、放出体及び放出体からなる群より選択されることを特徴とする請求項77に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項80】 放射性同位体が<sup>111</sup>インジウム、<sup>113</sup>インジウム、<sup>99m</sup>レニウム、<sup>105</sup>レニ

ウム、<sup>101</sup>レニウム、<sup>99m</sup>テクネチウム、<sup>121m</sup>テルル、<sup>122m</sup>テルル、<sup>125m</sup>テルル、<sup>165</sup>ツリウム、<sup>167</sup>ツリウム、<sup>168</sup>ツリウム、<sup>123</sup>ヨウ素、<sup>126</sup>ヨウ素、<sup>131</sup>ヨウ素、<sup>133</sup>ヨウ素、<sup>81m</sup>クリプトン、<sup>33</sup>キセノン、<sup>90</sup>イットリウム、<sup>213</sup>ビスマス、<sup>77</sup>臭素、<sup>18</sup>フッ素、<sup>95</sup>ルテニウム、<sup>97</sup>ルテニウム、<sup>103</sup>ルテニウム、<sup>105</sup>ルテニウム、<sup>107</sup>水銀、<sup>203</sup>水銀、<sup>67</sup>ガリウム及び<sup>68</sup>ガリウムからなる群より選択されることを特徴とする、請求項77に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項81】 治療薬がドキシソルピシン(アドリアマイシン)、モルホリノドキシソルピシン、メトキシモルホリニルドキシソルピシン、シスプラチン、タキソール、カリケアマイシン、ピンクリスチン、シタラビン(Ara-C)、シクロホスファミド、プレドニゾン、ダウノルビシン、モルホリノダウノルビシン、メトキシモルフォリノダウノルビシン、イダルビシン、フルダラビン、クロラムブシル、インターフェロン、ヒドロキシウレア、テモゾロマイド、サリドマイド及びブレオマイシン、及びその誘導体・組合せからなる群より選択されることを特徴とする、請求項77に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項82】 1つ又は複数の薬剤との結合又は複合が可能な基剤又は担体と結合又は複合した請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項83】 基剤又は担体がデキストラン、親油性ポリマー、疎水性ポリマー、HPMA及びリボソームからなる群より選択されることを特徴とする請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項84】 放射性同位体又は又は他の造影剤と結合又は複合した請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項85】 請求項84に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を含む診断キット。

【請求項86】 請求項18~20、23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を、細胞ローリングを阻害する有効量含有する製剤組成物。

【請求項87】 請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を、炎症を阻害する有効量含有する製剤組成物。

【請求項88】 請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を、自己免疫疾患を阻害する有効量含有する製剤組成物。

【請求項89】 請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を、血栓症を阻害する有効量含有する製剤組成物。

【請求項90】 請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を、再狭窄を阻害する有効量含有する製剤組成物。

【請求項91】 請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を、転移を阻害する有効量含有する製剤組成物。

【請求項92】 請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を、腫瘍細胞の成長及び/又は複製を阻害する有効量含有する製剤組成物。

【請求項93】 請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を、腫瘍細胞の死亡率を高める有効量含有する製剤組成物。

【請求項 9 4】 請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を、白血病細胞の成長及び/又は複製を阻害する有効量含有する製剤組成物。

【請求項 9 5】 請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を、白血病細胞の死亡率を高める有効量含有する製剤組成物。

【請求項 9 6】 請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を、抗疾病薬による傷害への病変細胞の感受性を増進する有効量含有する製剤組成物。

【請求項 9 7】 請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を、抗がん薬による傷害への腫瘍細胞の感受性を増進する有効量含有する製剤組成物。

【請求項 9 8】 請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を、抗白血病薬による傷害への白血病の感受性を増進する有効量含有する製剤組成物。

【請求項 9 9】 請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を、腫瘍患者の腫瘍細胞数の増加を阻害する有効量含有する製剤組成物。

【請求項 1 0 0】 請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を、腫瘍患者の腫瘍細胞数を減少させる有効量含有する製剤組成物。

【請求項 1 0 1】 請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を、白血病患者の白血病細胞数の増加を阻害する有効量含有する製剤組成物。

【請求項 1 0 2】 請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を、白血病患者の白血病細胞数を減少させる有効量含有する製剤組成物。

【請求項 1 0 3】 請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を、細胞-細胞、細胞-マトリックス、血小板-マトリックス、血小板-血小板及び/又は細胞-血小板間の凝集を阻害する有効量含有する製剤組成物。

【請求項 1 0 4】 請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を、細胞-細胞、細胞-マトリックス、血小板-マトリックス、血小板-血小板及び/又は細胞-血小板間の複合体形成を阻害する有効量含有する製剤組成物。

【請求項 1 0 5】 請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を、細胞-細胞、細胞-マトリックス、血小板-マトリックス、血小板-血小板及び/又は細胞-血小板間の接着を阻害する有効量含有する製剤組成物。

【請求項 1 0 6】 抗がん薬、抗転移薬、抗白血病薬、抗疾病薬、抗接着薬、抗血栓薬、抗再狭窄薬、抗自己免疫薬、抗凝集薬、抗菌薬、抗ウイルス薬及び抗炎症薬からなる群より選択される薬剤と複合又は結合した請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を含有する製剤組成物。

【請求項 1 0 7】 薬剤がアシクロビル、ガンシクロビル及びジドブジンからなる群より選択される抗ウイルス薬であることを特徴とする、請求項 106 に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を含有する製剤組成物。

【請求項 1 0 8】 薬剤がシロスタゾール、ダルテパリンナトリウム、レビパリンナトリウム及びアスピリンからなる群より選択される抗血栓/再狭窄薬であることを特徴とする

、請求項106に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を含有する製剤組成物。

【請求項109】 薬剤がザルトプロフェン、プラノプロフェン、ドロキシカム、acetylsalicylic 17、ジクロフェナク、イブプロフェン、デキシブプロフェン、スリダク、ナプロキセン、アムトルメチン、セレコキシブ、インドメタシン、ロフェコキシブ及びニメスリドからなる群より選択される抗炎症薬であることを特徴とする、請求項106に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を含有する製剤組成物。

【請求項110】 薬剤がレフルノマイド、デニロイキンジフチトクス(denileukin diftitox)、スブロイム(subreum)、WinRho SDF、デフィプロチド及びシクロホスファミドからなる群より選択される抗自己免疫薬であることを特徴とする、請求項106に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を含有する製剤組成物。

【請求項111】 薬剤がリマプロスト、クロルクロメン及びヒアルロン酸からなる群より選択される抗接着/抗凝集薬であることを特徴とする、請求項106に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を含有する製剤組成物。

【請求項112】 薬剤が毒素、放射性同位体及び治療薬からなる群より選択される、請求項106に記載の製剤組成物。

【請求項113】 毒素がgelonin、Pseudomonas外毒素(PE)、PE40、PE38、リシン(ricin)、及びそれらの修飾体、誘導体からなる群より選択されることを特徴とする、請求項106に記載の製剤組成物。

【請求項114】 放射性同位体が 放出体、陽電子放出核、X線放出体、放出体及び放出体からなる群より選択されることを特徴とする、請求項106に記載の製剤組成物。

【請求項115】 放射性同位体が<sup>111</sup>インジウム、<sup>113</sup>インジウム、<sup>99m</sup>レニウム、<sup>105</sup>レニウム、<sup>101</sup>レニウム、<sup>99m</sup>テクネチウム、<sup>121m</sup>テルル、<sup>122m</sup>テルル、<sup>125m</sup>テルル、<sup>165</sup>ツリウム、<sup>167</sup>ツリウム、<sup>168</sup>ツリウム、<sup>123</sup>ヨウ素、<sup>126</sup>ヨウ素、<sup>131</sup>ヨウ素、<sup>133</sup>ヨウ素、<sup>81m</sup>クリプトン、<sup>33</sup>キセノン、<sup>90</sup>イットリウム、<sup>213</sup>ビスマス、<sup>77</sup>臭素、<sup>18</sup>フッ素、<sup>95</sup>ルテニウム、<sup>97</sup>ルテニウム、<sup>103</sup>ルテニウム、<sup>105</sup>ルテニウム、<sup>107</sup>水銀、<sup>203</sup>水銀、<sup>67</sup>ガリウム及び<sup>68</sup>ガリウムからなる群より選択されることを特徴とする、請求項106に記載の製剤組成物。

【請求項116】 治療薬がドキシソルピシン(アドリアマイシン)、モルホリノドキシソルピシン、メトキシモルホリニルドキシソルピシン、アドリアマイシン、シスプラチン、タキソール、カリケアマイシン、ピンクリスチン、シタラピン(Ara-C)、シクロホスファミド、プレドニゾン、ダウノルピシン、モルホリノダウノルピシン、メトキシモルホリニルダウノルピシン、イダルピシン、フルダラピン、クロラムブシル、インターフェロン、ヒドロキシウレア、テモゾロマイド、サリドマイド及びブレオマイシン、及びその誘導体・組合せからなる群より選択されることを特徴とする、請求項106に記載の製剤組成物。

【請求項117】 1つ又は複数の薬剤との結合又は複合が可能な基剤又は担体と結合又は複合した請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を含有する製剤組成物。

【請求項118】 基剤又は担体がデキストラン、親油性ポリマー、疎水性ポリマー、HPMA及びリボソームからなる群より選択されることを特徴とする、請求項117に記載の製剤組成物。

【請求項119】 細胞ローリングを阻害しうる医薬の製造への、請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体の使用。

【請求項120】 炎症を阻害しうる医薬の製造への、請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体の使用。

【請求項 1 2 1】 自己免疫疾患を阻害しうる医薬の製造への、請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体の使用。

【請求項 1 2 2】 再狭窄を阻害しうる医薬の製造への、請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体の使用。

【請求項 1 2 3】 血栓症を阻害しうる医薬の製造への、請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体の使用。

【請求項 1 2 4】 転移を阻害しうる医薬の製造への、請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体の使用。

【請求項 1 2 5】 腫瘍細胞の成長及び/又は複製を阻害しうる医薬の製造への、請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体の使用。

【請求項 1 2 6】 腫瘍細胞の死亡率を高めうる医薬の製造への、請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体の使用。

【請求項 1 2 7】 白血病細胞の成長及び/又は複製を阻害しうる医薬の製造への、請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体の使用。

【請求項 1 2 8】 白血病細胞の死亡率を高めうる医薬の使用への、請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体使用。

【請求項 1 2 9】 抗疾病薬による傷害への病変細胞の感受性を増進しうる医薬の製造への、請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体の使用。

【請求項 1 3 0】 抗がん薬による傷害への腫瘍細胞の感受性を増進しうる医薬の製造への、請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体の使用。

【請求項 1 3 1】 抗白血病薬による傷害への白血病の感受性を増進しうる医薬の製造への、請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体の使用。

【請求項 1 3 2】 腫瘍患者の腫瘍細胞数の増加を阻害しうる医薬の製造への、請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体の使用。

【請求項 1 3 3】 腫瘍患者の腫瘍細胞数を減少させうる医薬の製造への、請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体の使用。

【請求項 1 3 4】 白血病患者の白血病細胞数の増加を阻害しうる医薬の製造への、請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体の使用。

【請求項 1 3 5】 白血病患者の白血病細胞数を減少させうる医薬の製造への、請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体の使用。

【請求項 1 3 6】 細胞-細胞、細胞-マトリックス、血小板-マトリックス、血小板-血小板及び/又は細胞-血小板間の複合体形成を阻害しうる医薬の製造への、請求項 18～20、又は 23～25 のいずれか 1 項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は 1 以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体の使用。

【請求項 1 3 7】 細胞-細胞、細胞-マトリックス、血小板-マトリックス、血小板-血小

板及び/又は細胞-血小板間の凝集を阻害しうる医薬の製造への、請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体の使用。

【請求項138】 細胞-細胞、細胞-マトリックス、血小板-マトリックス、血小板-血小板及び/又は細胞-血小板間の接着を阻害しうる医薬の製造への、請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体の使用。

【請求項139】 抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を抗がん薬、抗転移薬、抗白血病薬、抗疾病薬、抗接着薬、抗血栓薬、抗再狭窄薬、抗自己免疫薬、抗凝集薬、抗菌薬、抗ウイルス薬及び抗炎症薬からなる群より選択される薬剤と複合又は結合することを特徴とする、請求項119~138のいずれか1項の方法。

【請求項140】 薬剤がアシクロビル、ガンシクロビル及びジドブジンからなる群より選択される抗ウイルス薬であることを特徴とする、請求項139の方法。

【請求項141】 薬剤がシロスタゾール、ダルテパリンナトリウム、レビパリンナトリウム及びアスピリンからなる群より選択される抗血栓/再狭窄薬であることを特徴とする、請求項139の方法。

【請求項142】 薬剤がザルトプロフェン、プラノプロフェン、ドロキシカム、acetylsalicylic 17、ジクロフェナク、イブプロフェン、デキシブプロフェン、スリダク、ナプロキセン、アムトルメチン、セレコキシブ、インドメタシン、ロフェコキシブ及びニメスリドからなる群より選択される抗炎症薬であることを特徴とする、請求項139の方法。

【請求項143】 薬剤がレフルノマイド、デニロイキンジフチトクス(denileukin diftitox)、スブロイム(subreum)、WinRho SDF、デフィプロチド及びシクロホスファミドからなる群より選択される抗自己免疫薬であることを特徴とする、請求項139の方法。

【請求項144】 薬剤がリマプロスト、クロルクロメン及びヒアルロン酸からなる群より選択される抗接着/抗凝集薬であることを特徴とする、請求項139の方法。

【請求項145】 薬剤が毒素、放射性同位体及び治療薬からなる群より選択されることを特徴とする、請求項139の方法。

【請求項146】 毒素がgelonin、Pseudomonas外毒素(PE)、PE40、PE38、リシン(ricin)、及びそれらの修飾体、誘導体からなる群より選択されることを特徴とする、請求項139の方法。

【請求項147】 放射性同位体が 放出体、陽電子放出核、X線放出体、放出体及び放出体からなる群より選択されることを特徴とする、請求項139の方法。

【請求項148】 放射性同位体が<sup>111</sup>インジウム、<sup>113</sup>インジウム、<sup>99m</sup>レニウム、<sup>105</sup>レニウム、<sup>101</sup>レニウム、<sup>99m</sup>テクネチウム、<sup>121m</sup>テルル、<sup>122m</sup>テルル、<sup>125m</sup>テルル、<sup>165</sup>ツリウム、<sup>167</sup>ツリウム、<sup>168</sup>ツリウム、<sup>123</sup>ヨウ素、<sup>126</sup>ヨウ素、<sup>131</sup>ヨウ素、<sup>133</sup>ヨウ素、<sup>81</sup>mクリプトン、<sup>33</sup>キセノン、<sup>90</sup>イットリウム、<sup>213</sup>ビスマス、<sup>77</sup>臭素、<sup>18</sup>フッ素、<sup>95</sup>ルテニウム、<sup>97</sup>ルテニウム、<sup>103</sup>ルテニウム、<sup>105</sup>ルテニウム、<sup>107</sup>水銀、<sup>203</sup>水銀、<sup>67</sup>ガリウム及び<sup>68</sup>ガリウムからなる群より選択されることを特徴とする、請求項139の方法。

【請求項149】 治療薬がドキシソルピシン(アドリアマイシン)、モルホリノドキシソルピシン、メトキシモルホリニルドキシソルピシン、シスプラチン、タキソール、カリケアマイシン、ピンクリスチン、シタラピン(Ara-C)、シクロホスファミド、プレドニゾン、ダウノルピシン、モルホリノダウノルピシン、メトキシモルホリニルダウノルピシン、イダルピシン、フルダラビン、クロラムブシル、インターフェロン、ヒドロキシウレア、テモゾロマイド、サリドマイド及びブレオマイシン、及びその誘導体・組合せからなる群より選択されることを特徴とする、請求項139の方法。

【請求項150】 抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を、1つ又は複数の薬剤との結合又は複合が可能な基剤又は担体と結合又は複合させることを特徴とする、請求項119~138のいずれか1項の方法。

【請求項151】 基剤又は担体がデキストラン、親油性ポリマー、疎水性ポリマー、HPMA及びリボソームからなる群より選択されることを特徴とする、請求項150の方法。

【請求項152】 細胞ローリングを阻害しうる医薬として用いる請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項153】 炎症を阻害しうる医薬として用いる請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項154】 自己免疫疾患を阻害しうる医薬として用いる請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項155】 再狭窄を阻害しうる医薬として用いる請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項156】 血栓症を阻害しうる医薬として用いる請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項157】 転移を阻害しうる医薬として用いる請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項158】 腫瘍細胞の成長及び/又は複製を阻害しうる医薬として用いる請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項159】 腫瘍細胞の死亡率を高めうる医薬として用いる請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項160】 白血病細胞の成長及び/又は複製を阻害しうる医薬として用いる請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項161】 白血病細胞の死亡率を高めうる医薬として用いる請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項162】 抗疾病薬による傷害への病変細胞の感受性を増進しうる医薬として用いる請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項163】 抗がん薬による傷害への腫瘍細胞の感受性を増進しうる医薬として用いる請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項164】 抗白血病薬による傷害への白血病の感受性を増進しうる医薬として用いる請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項165】 腫瘍患者の腫瘍細胞数の増加を阻害しうる医薬として用いる請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項166】 腫瘍患者の腫瘍細胞数を減少させうる医薬として用いる請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項167】 白血病患者の白血病細胞数の増加を阻害しうる医薬として用いる請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項168】 白血病患者の白血球細胞数を減少させる医薬として用いる請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項169】 細胞-細胞、細胞-マトリックス、血小板-マトリックス、血小板-血小板及び/又は細胞-血小板間の複合体形成を阻害する医薬として用いる請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項170】 細胞-細胞、細胞-マトリックス、血小板-マトリックス、血小板-血小板及び/又は細胞-血小板間の凝集を阻害する医薬として用いる請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項171】 細胞-細胞、細胞-マトリックス、血小板-マトリックス、血小板-血小板及び/又は細胞-血小板間の接着を阻害する医薬として用いる請求項18~20、又は23~25のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項172】 抗がん薬、抗転移薬、抗白血病薬、抗疾病薬、抗接着薬、抗血栓薬、抗再狭窄薬、抗自己免疫薬、抗凝集薬、抗菌薬、抗ウイルス薬及び抗炎症薬からなる群より選択される薬剤と複合又は結合した、請求項152~171のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項173】 薬剤がアシクロビル、ガンシクロビル及びジドブジンからなる群より選択される抗ウイルス薬であることを特徴とする、請求項172の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項174】 薬剤がシロスタゾール、ダルテパリンナトリウム、レピパリンナトリウム及びアスピリンからなる群より選択される抗血栓/再狭窄薬であることを特徴とする、請求項172の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項175】 薬剤がザルトプロフェン、プラノプロフェン、ドロキシカム、acetylsalicylic 17、ジクロフェナク、イブプロフェン、デキシブプロフェン、スリダク、ナプロキセン、アムトルメチン、セレコキシブ、インドメタシン、ロフェコキシブ及びニメスリドからなる群より選択される抗炎症薬であることを特徴とする、請求項172の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項176】 薬剤がレフルノマイド、デニロイキンジフチトクス(denileukin diftitox)、スブロイム(subreum)、WinRho SDF、デフィプロチド及びシクロホスファミドからなる群より選択される抗自己免疫薬であることを特徴とする、請求項172の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項177】 薬剤がリマプロスト、クロルクロメン及びヒアルロン酸からなる群より選択される抗接着/抗凝集薬であることを特徴とする、請求項172の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項178】 薬剤が毒素、放射性同位体及び治療薬からなる群より選択されることを特徴とする、請求項172の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項179】 毒素がgelonin、Pseudomonas外毒素(PE)、PE40、PE38、リシン(ricin)、及びそれらの修飾体、誘導体からなる群より選択されることを特徴とする、請求項172の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項180】 放射性同位体が 放出体、陽電子放出核、X線放出体、放出体及び放出体からなる群より選択されることを特徴とする、請求項172の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項181】 放射性同位体が<sup>111</sup>インジウム、<sup>113</sup>インジウム、<sup>99m</sup>レニウム、<sup>105</sup>レニウム、<sup>101</sup>レニウム、<sup>99m</sup>テクネチウム、<sup>121m</sup>テルル、<sup>122m</sup>テルル、<sup>125m</sup>テルル、<sup>165</sup>ツリウム、<sup>167</sup>ツリウム、<sup>168</sup>ツリウム、<sup>123</sup>ヨウ素、<sup>126</sup>ヨウ素、<sup>131</sup>ヨウ素、<sup>133</sup>ヨウ素、<sup>81</sup>

<sup>m</sup>クリプトン、<sup>33</sup>キセノン、<sup>90</sup>イットリウム、<sup>213</sup>ビスマス、<sup>77</sup>臭素、<sup>18</sup>フッ素、<sup>95</sup>ルテニウム、<sup>97</sup>ルテニウム、<sup>103</sup>ルテニウム、<sup>105</sup>ルテニウム、<sup>107</sup>水銀、<sup>203</sup>水銀、<sup>67</sup>ガリウム及び<sup>68</sup>ガリウムからなる群より選択されることを特徴とする、請求項172の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項182】 治療薬がドキシソルピシン(アドリアマイシン)、モルホリノドキシソルピシン、メトキシモルホリニドキシソルピシン、シスプラチン、タキソール、カリケアマイシン、ピンクリスチン、シタラピン(Ara-C)、シクロホスファミド、プレドニゾン、ダウノルピシン、モルホリノダウノルピシン、メトキシモルホリニルダウノルピシン、イダルピシン、フルダラビン、クロラムブシル、インターフェロン、ヒドロキシウレア、テモゾロマイド、サリドマイド及びブレオマイシン、及びその誘導体・組合せからなる群より選択されることを特徴とする、請求項172の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項183】 1つ又は複数の薬剤との結合又は複合が可能な基剤又は担体と結合又は複合した、請求項152~171のいずれか1項に記載の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項184】 基剤又は担体がデキストラン、親油性ポリマー、疎水性ポリマー、HPMA及びリポソームからなる群より選択されることを特徴とする、請求項183の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項185】 アミノ酸276、278及び279のうち少なくとも1つが硫酸化していることを特徴とするGPIb アミノ酸配列Tyr276~Glu282を含む単離エピトープ。

【請求項186】 GPIb アミノ酸283~285をさらに含む、請求項185の単離エピトープ。

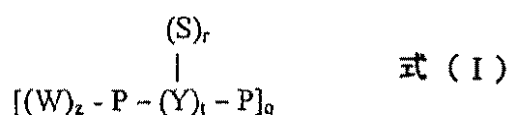
【請求項187】 請求項185のエピトープに結合しうる抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体であって、請求項185のエピトープがGPIb アミノ酸283~285をさらに含むときに該結合が増進されることを特徴とする抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体。

【請求項188】 配列YDYYPEEのエピトープを含む見掛け分子質量約40kDaの単離GPIb N末端側ペプチドであって、該配列中1以上のチロシン残基が硫酸化していることを特徴とするペプチド。

【請求項189】 アミノ酸1~282からなり、アミノ酸276、278及び279のうち少なくとも1つが硫酸化している単離GPIb ペプチド。

【請求項190】 少なくとも第1及び第2抗原結合性断片を含む抗体多量体であって、少なくとも第1又は第2抗原結合性断片が、もしくは両断片が以下の式：

【化6】



(式中、

Wは、アスパラギン酸とグルタミン酸とを除く任意のアミノ酸であり、

Yは、硫酸化可能な任意の天然部分であり、

Pは、

【化7】

$(A)_m (A)_n (X)_u$  又は  $(X)_u (A)_n (A)_m$  又は  $(A)_n (X)_u (A)_m$

又は  $(A)_n (A)_m (X)_u$  又は  $(X)_u (A)_m (A)_n$  又は  $(A)_m (X)_u (A)_n$

であり、

Sは、スルフェート又は硫酸化分子であり、

Xは、任意のアミノ酸であり、但し、ただしアスパラギン酸、グルタミン酸又はチロシンを除く、

Aは、任意の負荷電アミノ酸、もしくはロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、セリン又はグリシンであり、

qは、1~6であり、

zは、0、1又は2であり、

rは、0又は1であり、

tは、1、2又は3であり、

uは、0~2であり、

nは、0~3であり、

mは、0~3

であるが、ここで、n=0ならばm>0; m=0ならばn>0; q=1ならばr=1であり、またq>1ならば1以上のYが硫酸化している。) )

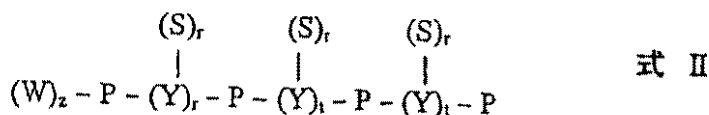
を含むエピトープと結合又は交差反応しうることを特徴とする抗体多量体。

【請求項191】 Wがグリシンであり、Yがチロシンのペプチドコンジュゲートもしくはアスパラギン、セリン又はトレオニンのグリココンジュゲートであり、Aがグルタミン酸、カルボキシグルタミン酸又はアスパラギン酸であり、qが1、2又は3であるエピトープと第1又は第2抗原結合性断片が、もしくは両断片が結合又は交差反応することを特徴とする、請求項190の抗体多量体。

【請求項192】 Yがチロシンのペプチドコンジュゲートであり、qが3であり、rが1であるエピトープと第1又は第2抗原結合性断片が、もしくは両断片が結合又は交差反応することを特徴とする、請求項190の抗体多量体。

【請求項193】 少なくとも第1及び第2抗原結合性断片を含む抗体多量体であって、第1又は第2抗原結合性断片が、もしくは両断片が以下の式：

【化8】



(式中、

Wは、アスパラギン酸とグルタミン酸とを除く任意のアミノ酸であり、

Yは、硫酸化可能な任意の天然部分であり、

Pは、

【化9】

$$(A)_m (A)_n (X)_u \text{ 又は } (X)_u (A)_n (A)_m \text{ 又は } (A)_n (X)_u (A)_m$$

$$\text{又は } (A)_n (A)_m (X)_u \text{ 又は } (X)_u (A)_m (A)_n \text{ 又は } (A)_m (X)_u (A)_n$$

であり、

Sは、スルフェート又は硫酸化分子であり、

Xは、任意のアミノ酸であり、但し、アスパラギン酸、グルタミン酸又はチロシンを除く、

Aは、任意の負荷電アミノ酸、もしくはロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、セリン又はグリシンであり、

zは、0、1又は2であり、

rは、0又は1であり、

tは、1、2又は3であり、

uは、0~2であり、

nは、0~3であり、

mは、0~3

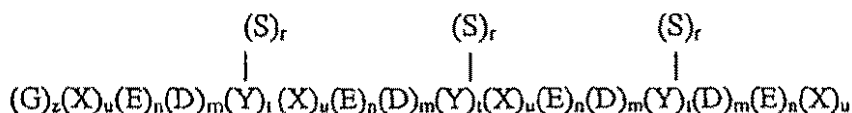
であるが、ここで、n=0ならばm>0; m=0ならばn>0である; 1以上のYが硫酸化している。)を含むエピトープと結合又は交差反応しうることを特徴とする抗体多量体。

【請求項194】 Wがグリシンであり、Yがチロシンのペプチドコンジュゲートもしくはアスパラギン、セリン又はトレオニンのグリココンジュゲートであり、Aがグルタミン酸、カルボキシグルタミン酸又はアスパラギン酸、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、セリン又はグリシンであるエピトープと第1又は第2抗原結合性断片が、もしくは両断片が結合又は交差反応することを特徴とする、請求項193の抗体多量体。

【請求項195】 Yがチロシンのペプチドコンジュゲートであり、qが3であり、rが1であるエピトープと第1又は第2抗原結合性断片が、もしくは両断片が結合又は交差反応することを特徴とする、請求項193の抗体多量体。

【請求項196】 少なくとも第1及び第2抗原結合性断片を含む抗体多量体であって、少なくとも第1又は第2抗原結合性断片が、もしくは両断片が以下の式：

【化10】



式 III

(式中、

Gは、グリシンであり、

Eは、グルタミン酸であり、

Dは、アスパラギン酸であり、

Yは、チロシンであり、

Sは、スルフェート又は硫酸分子であり、

Xは、前記以外の任意のアミノ酸であり、

zは、0、1又は2であり、

tは、1、2又は3であり、

rは、0又は1であり、  
 uは、0~2であり、  
 nは、0~3であり、  
 mは、0~3

であるが、ここで、1以上のYが硫酸化している；n=0ならばm>0；m=0ならばn>0。）  
 を含むエピトープと結合又は交差反応しうることを特徴とする抗体多量体。

【請求項197】 rが1であるエピトープと第1又は第2抗原結合性断片が、もしくは両断片が結合又は交差反応することを特徴とする、請求項196の抗体多量体。

【請求項198】 二量体、三量体又は四量体である、請求項190、193又は196の抗体多量体。

【請求項199】 二量体である、請求項198の抗体多量体。

【請求項200】 第1及び第2抗原結合性断片のうち少なくとも1つがY1及びY17のscFvフラグメントより選択される、請求項199の二量体。

【請求項201】 第1及び第2抗原結合性断片がジスルフィド結合によって結合される、請求項199の二量体。

【請求項202】 第1及び第2抗原結合性断片がY1-Cys-KAKである、請求項201の二量体。

【請求項203】 第1及び第2抗原結合性断片が、5~20アミノ酸のポリペプチドリンカーによって結合される、請求項199の二量体。

【請求項204】 ポリペプチドリンカーが5アミノ酸を含む、請求項203の二量体。

【請求項205】 ポリペプチドリンカーがGly<sub>4</sub>Serである、請求項204の二量体。

【請求項206】 三量体である、請求項198の抗体多量体。

【請求項207】 3つの抗原結合性断片を含み、そのうち少なくとも1つはY1 scFvフラグメント又はY17 scFvフラグメントである、請求項206の三量体。

【請求項208】 抗原結合性断片がポリペプチドリンカーによって結合される、請求項207の三量体。

【請求項209】 ポリペプチドリンカーが1~5アミノ酸を含む、請求項208の三量体。

【請求項210】 四量体である、請求項198の抗体多量体。

【請求項211】 4つの抗原結合性断片を含み、そのうち少なくとも1つはY1 scFvフラグメント又はY17 scFvフラグメントである、請求項210の四量体。

【請求項212】 抗原結合性断片がポリペプチドリンカーによって結合される、請求項211の四量体。

【請求項213】 ポリペプチドリンカーが1~5アミノ酸を含む、請求項212の四量体。

【請求項214】 4つの抗原結合性断片がストレプトアビジン-ビオチン会合を介して複合体を形成する、請求項210の四量体。

【請求項215】 同一の抗原結合性断片を含む、請求項198の抗体多量体。

【請求項216】 少なくとも第1又は第2抗原結合性断片がSEQ ID NO:8を含む第1超可変領域をもつ、請求項198の抗体多量体。

【請求項217】 少なくとも第1又は第2抗原結合性断片が、もしくは両断片がSEQ ID NO:20を含む第1超可変領域をもつ、請求項198の抗体多量体。

【請求項218】 少なくとも第1又は第2抗原結合性断片が、もしくは両断片がSEQ ID NO:115を含む第2超可変領域及び/又はSEQ ID NO:114を含む第3超可変領域及びをもつ、請求項216又は217の抗体多量体。

【請求項219】 PSGL-1、フィブリノゲン、GPIIb/IIIa、ヘパリン、ルミカン、補体複合体4(CC4)、インターフェロンγ、インヒビター及びプロトロンビンからなる群より選択される2以上の異なる分子に結合し、請求項190、193、196、216及び217のいずれか1項の抗体多量体。

【請求項220】 PSGL-1、フィブリノゲン、GPIIb/IIIa、ヘパリン、ルミカン、補体複合体4(CC4)、インターフェロンγ、インヒビター及びプロトロンビンからなる群より選択される2以上の異なる分子に結合し、かつB-CLL細胞、AML細胞、多発性骨髄腫細胞及び転移性細胞か

らなる群より選択される1以上の細胞型にも結合しうる、請求項190、193、196、216及び217のいずれか1項の抗体多量体。

【請求項221】 第1及び第2抗原結合性断片を含む抗体二量体であって、該第1又は第2抗原結合性断片が、もしくは両断片がSEQ ID NO:8 [Y1 CDR3]のアミノ酸配列を含む超可変領域をもつことを特徴とする抗体二量体。

【請求項222】 第1及び第2抗原結合性断片を含む抗体二量体であって、該第1又は第2抗原結合性断片が、もしくは両断片がSEQ ID NO:20 [Y17 CDR3]のアミノ酸配列を含む超可変領域をもつことを特徴とする抗体二量体。

【請求項223】 第1又は第2抗原結合性断片が、もしくは両断片がSEQ ID NO:115を含む第2超可変領域及び/又はSEQ ID NO:114を含む第3超可変領域及をもつ、請求項221又は222の抗体二量体。

【請求項224】 第1及び第2抗原結合性断片を含む抗体多量体であって、該第1又は第2抗原結合性断片が、もしくは両断片が2以上のエピトープすなわち各々1つ又は複数の硫酸化チロシン残基と2以上の酸性アミノ酸からなる1以上のクラスターとを含む2以上のエピトープと交差反応しうることを特徴とする抗体多量体。

【請求項225】 PSGL-1と交差反応しうる、請求項224の抗体多量体。

【請求項226】 1以上の硫酸化チロシン残基を含むQATEYEYL DYDFLPETEに結合する、請求項224の抗体多量体。

【請求項227】 GB1b- と交差反応しうる、請求項224の抗体多量体。

【請求項228】 1以上の硫酸化チロシン残基を含むDEGDTDLY DYPPEEDTEGDに結合する、請求項224の抗体多量体。

【請求項229】 1以上の硫酸化チロシン残基を含むTDLYDYYP EEDTEに結合する、請求項224の抗体多量体。

【請求項230】 1以上の硫酸化チロシン残基を含むGDEGDTD LYDYYPに結合する、請求項224の抗体多量体。

【請求項231】 1以上の硫酸化チロシン残基を含むYDYYPEEに結合する、請求項224の抗体多量体。

【請求項232】 1以上の硫酸化チロシン残基を含むTDLYDYYPに結合する、請求項224の抗体多量体。

【請求項233】 フィブリノゲン と交差反応しうる、請求項224の抗体多量体。

【請求項234】 1以上の硫酸化チロシン残基を含むEPHAET EYDSLYPEDに結合する、請求項233の抗体複合体。

【請求項235】 ヘパリンと交差反応しうる、請求項224抗体多量体。

【請求項236】 補体複合体4(CC4)と交差反応しうる、請求項224の抗体多量体。

【請求項237】 B-CLL細胞、AML細胞、多発性骨髄腫細胞及び転移性細胞からなる群より選択される1以上の細胞型と交差反応しうる、請求項224の抗体多量体。

【請求項238】 請求項1、4、7、27及び28のいずれか1項に記載の抗体多量体を含有する製剤組成物。

【請求項239】 腫瘍細胞の死亡率を高める又は腫瘍細胞の抗がん薬による傷害への感受性を高める有効量の抗体多量体を含有する、請求項238の製剤組成物。

【請求項240】 白血病細胞の成長及び/又は複製を阻害する有効量の抗体多量体を含有する、請求項238の製剤組成物。

【請求項241】 異常な細胞-細胞、細胞-マトリックス、血小板-マトリックス、血小板-血小板、及び/又は血小板-細胞間の接着を阻害する有効量の抗体多量体を含有する、請求項238の製剤組成物。

【請求項242】 病変細胞の抗疾病薬による傷害への感受性を高める有効量の抗体多量体を含有する、請求項238の製剤組成物。

【請求項243】 白血病細胞の死亡率を高める又は白血病細胞の抗白血病薬による傷害への感受性を高める有効量の抗体多量体を含有する、請求項238の製剤組成物。

【請求項244】 抗がん薬、抗転移薬、抗白血病薬、抗疾病薬、抗接着薬、抗血栓薬、

抗再狭窄薬、抗自己免疫薬、抗凝集薬、抗菌薬、抗ウイルス薬及び抗炎症薬からなる群より選択される薬剤と複合又は結合した、請求項190、193、196、216及び217のいずれか1項に記載の抗体多量体を含有する製剤組成物。

【請求項245】 薬剤が毒素、放射性同位体及び治療薬からなる群より選択される、請求項244に記載の製剤組成物。

【請求項246】 薬剤がアシクロビル、ガンシクロビル及びジドブジンからなる群より選択される抗ウイルス薬である、請求項244の製剤組成物。

【請求項247】 薬剤がシロスタゾール、ダルテパリンナトリウム、レビパリンナトリウム及びアスピリンからなる群より選択される抗血栓/再狭窄薬である、請求項244の製剤組成物。

【請求項248】 薬剤がザルトプロフェン、プラノプロフェン、ドロキシカム、acetyl salicylic 17、ジクロフェナク、イブプロフェン、デキシブプロフェン、スリンダク、ナプロキセン、アムトルメチン、セレコキシブ、インドメタシン、ロフェコキシブ及びニメスリドからなる群より選択される抗炎症薬である、請求項244の製剤組成物。

【請求項249】 薬剤がレフルノマイド、デニロイキンジフチトクス(denileukin dift itox)、スブロイム(subreum)、WinRho SDF、デフィプロチド及びシクロホスファミドからなる群より選択される抗自己免疫薬である、請求項244の製剤組成物。

【請求項250】 薬剤がリマプロスト、クロルクロメン及びヒアルロン酸からなる群より選択される抗接着/抗凝集薬である、請求項244の製剤組成物。

【請求項251】 放射性同位体が 放出体、陽電子放出核、X線放出体、 放出体及び 放出体からなる群より選択される、請求項245の製剤組成物。

【請求項252】 放射性同位体が<sup>111</sup>インジウム、<sup>113</sup>インジウム、<sup>99m</sup>レニウム、<sup>105</sup>レニウム、<sup>101</sup>レニウム、<sup>99m</sup>テクネチウム、<sup>121m</sup>テルル、<sup>122m</sup>テルル、<sup>125m</sup>テルル、<sup>165</sup>ツリウム、<sup>167</sup>ツリウム、<sup>168</sup>ツリウム、<sup>123</sup>ヨウ素、<sup>126</sup>ヨウ素、<sup>131</sup>ヨウ素、<sup>133</sup>ヨウ素、<sup>81</sup>mクリプトン、<sup>33</sup>キセノン、<sup>90</sup>イットリウム、<sup>213</sup>ビスマス、<sup>77</sup>臭素、<sup>18</sup>フッ素、<sup>95</sup>ルテニウム、<sup>97</sup>ルテニウム、<sup>103</sup>ルテニウム、<sup>105</sup>ルテニウム、<sup>107</sup>水銀、<sup>203</sup>水銀、<sup>67</sup>ガリウム及び<sup>68</sup>ガリウムからなる群より選択される、請求項251の製剤組成物。

【請求項253】 治療薬がドキシソルピシン(アドリアマイシン)、モルホリノドキシソルピシン、メトキシモルホリニルドキシソルピシン、シスプラチン、タキソール、カリケアマイシン、ピンクリスチン、シタラピン(Ara-C)、シクロホスファミド、プレドニゾン、ダウノルピシン、モルホリノダウノルピシン、メトキシモルホリニルダウノルピシン、イダルピシン、フルダラピン、クロラムブシル、インターフェロン、ヒドロキシウレア、テモゾロマイド、サリドマイド及びブレオマイシン、並びにその誘導体及び組合せからなる群より選択される、請求項245の製剤組成物。

【請求項254】 1つ又は複数の薬剤との結合又は複合が可能な基剤又は担体と結合又は複合した、請求項244の製剤組成物。

【請求項255】 基剤又は担体がデキストラン、親油性ポリマー、疎水性ポリマー、HPMA及びリボソームからなる群より選択される、請求項254の製剤組成物。

【請求項256】 細胞ローリングを阻害する有効量の抗体多量体を含有する、請求項238の製剤組成物。

【請求項257】 炎症を阻害する有効量の抗体多量体を含有する、請求項238の製剤組成物。

【請求項258】 自己免疫疾患を阻害する有効量の抗体多量体を含有する、請求項238の製剤組成物。

【請求項259】 血栓症を阻害する有効量の抗体多量体を含有する、請求項238の製剤組成物。

【請求項260】 再狭窄を阻害する有効量の抗体多量体を含有する、請求項238の製剤組成物。

【請求項261】 転移を阻害する有効量の抗体多量体を含有する、請求項238の製剤組成物。

【請求項262】 腫瘍細胞の成長及び/又は複製を阻害し、腫瘍細胞の死亡率を高め、又は腫瘍細胞の抗がん薬による傷害への感受性を高める有効量の抗体多量体を含有する、請求項238の製剤組成物。

【請求項263】 白血病細胞の成長及び/又は複製を阻害し、白血病細胞の死亡率を高め、又は白血病細胞の抗白血病薬による傷害への感受性を高める有効量の抗体多量体を含有する、請求項238の製剤組成物。

【請求項264】 病変細胞の抗疾病薬による傷害への感受性を高める有効量の抗体多量体を含有する、請求項238の製剤組成物。

【請求項265】 細胞-細胞、細胞-マトリックス、血小板-マトリックス、血小板-血小板、及び/又は細胞-血小板間の凝集、接着又は複合体形成を阻害する有効量の抗体多量体を含有する、請求項238の製剤組成物。

【請求項266】 抗がん薬、抗転移薬、抗白血病薬、抗疾病薬、抗接着薬、抗血栓薬、抗再狭窄薬、抗自己免疫薬、抗凝集薬、抗菌薬、抗ウイルス薬及び抗炎症薬からなる群より選択される薬剤と複合又は結合した、請求項238の製剤組成物。

【請求項267】 薬剤がアシクロビル、ガンシクロビル及びジドブジンからなる群より選択される抗ウイルス薬である、請求項266の製剤組成物。

【請求項268】 抗体多量体が1つ又は複数の薬剤との結合又は複合が可能な基剤又は担体と結合又は複合した、請求項238の製剤組成物。

【請求項269】 基剤又は担体がデキストラン、親油性ポリマー、疎水性ポリマー、HPMA及びリポソームからなる群より選択される、請求項238の製剤組成物。

【請求項270】 細胞ローリングを阻害する医薬の製造への、請求項1、4、7、27及び28のいずれか1項に記載の抗体多量体の使用。

【請求項271】 炎症を阻害する医薬の製造への、請求項190、193、196、及び216~218のいずれか1項に記載の抗体多量体の使用。

【請求項272】 自己免疫疾患を阻害する医薬の製造への、請求項1、4、7、27及び28のいずれか1項に記載の抗体多量体の使用。

【請求項273】 再狭窄を阻害する医薬の製造への、請求項190、193、196、及び216~218のいずれか1項に記載の抗体多量体の使用。

【請求項274】 血栓症を阻害する医薬の製造への、請求項190、193、196、及び216~218のいずれか1項に記載の抗体多量体の使用。

【請求項275】 転移を阻害する医薬の製造への、請求項190、193、196、及び216~218のいずれか1項に記載の抗体多量体の使用。

【請求項276】 腫瘍細胞の成長及び/又は複製を阻害する医薬の製造への、請求項190、193、196、及び216~218のいずれか1項に記載の抗体多量体の使用。

【請求項277】 腫瘍細胞の死亡率を高める医薬の製造への、請求項190、193、196、及び216~218のいずれか1項に記載の抗体多量体の使用。

【請求項278】 白血病細胞の成長及び/又は複製を阻害する医薬の製造への、請求項190、193、196、及び216~218のいずれか1項に記載の抗体多量体の使用。

【請求項279】 白血病細胞の死亡率を高める医薬の製造への、請求項190、193、196、及び216~218のいずれか1項に記載の抗体多量体の使用。

【請求項280】 病変細胞の抗疾病薬による傷害への感受性を高める医薬の製造への、請求項190、193、196、及び216~218のいずれか1項に記載の抗体多量体の使用。

【請求項281】 腫瘍細胞の抗がん薬による傷害への感受性を高める医薬の製造への、請求項190、193、196、及び216~218のいずれか1項に記載の抗体多量体の使用。

【請求項282】 白血病細胞の抗白血病薬による傷害への感受性を高める医薬の製造への、請求項190、193、196、及び216~218のいずれか1項に記載の抗体多量体の使用。

【請求項283】 腫瘍患者の腫瘍細胞数の増加を阻害する医薬の製造への、請求項190、193、196、及び216~218のいずれか1項に記載の抗体多量体の使用。

【請求項284】 腫瘍患者の腫瘍細胞数を減少させる医薬の製造への、請求項190、193、196、及び216~218のいずれか1項に記載の抗体多量体の使用。

【請求項285】 白血病患者の白血球細胞数の増加を阻害する医薬の製造への、請求項190、193、196、及び216~218のいずれか1項に記載の抗体多量体の使用。

【請求項286】 白血病患者の白血球細胞数を減少させる医薬の製造への、請求項190、193、196、及び216~218のいずれか1項に記載の抗体多量体の使用。

【請求項287】 細胞-細胞、細胞-マトリックス、血小板-マトリックス、血小板-血小板、及び/又は細胞-血小板間の複合体形成を阻害する医薬の製造への、請求項190、193、196、及び216~218のいずれか1項に記載の抗体多量体の使用。

【請求項288】 細胞-細胞、細胞-マトリックス、血小板-マトリックス、血小板-血小板、及び/又は細胞-血小板間の凝集を阻害する医薬の製造への、請求項190、193、196、及び216~218のいずれか1項に記載の抗体多量体の使用。

【請求項289】 細胞-細胞、細胞-マトリックス、血小板-マトリックス、血小板-血小板、及び/又は細胞-血小板間の接着を阻害する医薬の製造への、請求項190、193、196、及び216~218のいずれか1項に記載の抗体多量体の使用。

【請求項290】 抗体多量体を抗がん薬、抗転移薬、抗白血病薬、抗疾病薬、抗接着薬、抗血栓薬、抗再狭窄薬、抗自己免疫薬、抗凝集薬、抗菌薬、抗ウイルス薬及び抗炎症薬からなる群より選択される薬剤と複合又は結合させることを特徴とする請求項270~289のいずれか1項の方法。

【請求項291】 薬剤がアシクロビル、ガンシクロビル及びジドブジンからなる群より選択される抗ウイルス薬であることを特徴とする、請求項290の方法。

【請求項292】 薬剤がシロスタゾール、ダルテパリンナトリウム、レビパリンナトリウム及びアスピリンからなる群より選択される抗血栓/再狭窄薬であることを特徴とする、請求項290の方法。

【請求項293】 薬剤がザルトプロフェン、プラノプロフェン、ドロキシカム、acetylsalicylic 17、ジクロフェナク、イブプロフェン、デキシブプロフェン、スリダク、ナプロキセン、アムトルメチン、セレコキシブ、インドメタシン、ロフェコキシブ及びニメスリドからなる群より選択される抗炎症薬であることを特徴とする、請求項290の方法。

【請求項294】 薬剤がレフルノマイド、デニロイキンジフチトクス(denileukin diftitox)、スブロイム(subreum)、WinRho SDF、デフィプロチド及びシクロホスファミドからなる群より選択される抗自己免疫薬であることを特徴とする、請求項290の方法。

【請求項295】 薬剤がリマプロスト、クロルクロメン及びヒアルロン酸からなる群より選択される抗接着/抗凝集薬であることを特徴とする、請求項290の方法。

【請求項296】 薬剤が毒素、放射性同位体及び治療薬からなる群より選択されることを特徴とする、請求項290の方法。

【請求項297】 毒素がgelonin、Pseudomonas外毒素(PE)、PE40、PE38、リシン(ricin)、もしくはそれらの修飾体又は誘導体からなる群より選択されることを特徴とする、請求項290の方法。

【請求項298】 放射性同位体が 放出体、陽電子放出核、X線放出体、放出体及び放出体からなる群より選択されることを特徴とする、請求項290の方法。

【請求項299】 放射性同位体が<sup>111</sup>インジウム、<sup>113</sup>インジウム、<sup>99m</sup>レニウム、<sup>105</sup>レニウム、<sup>101</sup>レニウム、<sup>99m</sup>テクネチウム、<sup>121m</sup>テルル、<sup>122m</sup>テルル、<sup>125m</sup>テルル、<sup>165</sup>ツリウム、<sup>167</sup>ツリウム、<sup>168</sup>ツリウム、<sup>123</sup>ヨウ素、<sup>126</sup>ヨウ素、<sup>131</sup>ヨウ素、<sup>133</sup>ヨウ素、<sup>81</sup>mクリプトン、<sup>33</sup>キセノン、<sup>90</sup>イットリウム、<sup>213</sup>ビスマス、<sup>77</sup>臭素、<sup>18</sup>フッ素、<sup>95</sup>ルテニウム、<sup>97</sup>ルテニウム、<sup>103</sup>ルテニウム、<sup>105</sup>ルテニウム、<sup>107</sup>水銀、<sup>203</sup>水銀、<sup>67</sup>ガリウム及び<sup>68</sup>ガリウムからなる群より選択されることを特徴とする、請求項290の方法。

【請求項300】 治療薬がドキシソルピシン(アドリアマイシン)、モルホリノドキシソルピシン、メトキシモルホリニルドキシソルピシン、シスプラチン、タキソール、カリケアマイシン、ピンクリスチン、シタラビン(Ara-C)、シクロホスファミド、プレドニゾン、ダウノルピシン、モルホリノダウノルピシン、メトキシモルホリニルダウノルピシン、イダルピシン、フルダラビン、クロラムブシル、インターフェロン、ヒドロキシウレア、テ

モゾロマイド、サリドマイド及びブレオマイシン、並びにその誘導体及び組合せからなる群より選択されることを特徴とする、請求項290の方法。

【請求項301】 抗体、その抗原結合性断片、又は抗体又はその抗原結合性断片を含むその複合体を、1つ又は複数の薬剤との結合又は複合が可能な基剤又は担体と結合又は複合させることを特徴とする、請求項270～289のいずれか1項の方法。

【請求項302】 基剤又は担体がデキストラン、親油性ポリマー、疎水性ポリマー、HPMA及びリポソームからなる群より選択されることを特徴とする請求項301の方法。

【請求項303】 細胞ローリングを阻害する医薬として用いる、請求項190、193、196、及び216～218のいずれか1項に記載の抗体多量体。

【請求項304】 炎症を阻害する医薬として用いる、請求項190、193、196、及び216～218のいずれか1項に記載の抗体多量体。

【請求項305】 自己免疫疾患を阻害する医薬として用いる、請求項190、193、196、及び216～218のいずれか1項に記載の抗体多量体。

【請求項306】 再狭窄を阻害する医薬として用いる、請求項190、193、196、及び216～218のいずれか1項に記載の抗体多量体。

【請求項307】 血栓症を阻害する医薬として用いる、請求項190、193、196、及び216～218のいずれか1項に記載の抗体多量体。

【請求項308】 転移を阻害する医薬として用いる、請求項190、193、196、及び216～218のいずれか1項に記載の抗体多量体。

【請求項309】 腫瘍細胞の成長及び/又は複製を阻害する医薬として用いる、請求項190、193、196、及び216～218のいずれか1項に記載の抗体多量体。

【請求項310】 腫瘍細胞の死亡率を高める医薬として用いる、請求項190、193、196、及び216～218のいずれか1項に記載の抗体多量体。

【請求項311】 白血病細胞の成長及び/又は複製を阻害する医薬として用いる、請求項190、193、196、及び216～218のいずれか1項に記載の抗体多量体。

【請求項312】 白血病細胞の死亡率を高める医薬として用いる、請求項190、193、196、及び216～218のいずれか1項に記載の抗体多量体。

【請求項313】 病変細胞の抗疾病薬による傷害への感受性を高める医薬として用いる、請求項190、193、196、及び216～218のいずれか1項に記載の抗体多量体。

【請求項314】 腫瘍細胞の抗がん薬による傷害への感受性を高める医薬として用いる、請求項190、193、196、及び216～218のいずれか1項に記載の抗体多量体。

【請求項315】 白血病細胞の抗白血病薬による傷害への感受性を高める医薬として用いる、請求項190、193、196、及び216～218のいずれか1項に記載の抗体多量体。

【請求項316】 腫瘍患者の腫瘍細胞数の増加を阻害する医薬として用いる、請求項190、193、196、及び216～218のいずれか1項に記載の抗体多量体。

【請求項317】 腫瘍患者の腫瘍細胞数を減少させる医薬として用いる、請求項190、193、196、及び216～218のいずれか1項に記載の抗体多量体。

【請求項318】 ヒト・モノクローナル抗体 scFv-Y1 の可変長分子鎖と交差反応するポリクローナル抗体、抗体断片又は抗体複合体。

【請求項319】 ヒト・モノクローナル抗体 scFv-Y1 の可変長分子鎖の NdeI-EcoRI 制限断片と交差反応する、請求項318のポリクローナル抗体、抗体断片又は抗体複合体。

【請求項320】 請求項318又は319の抗体又は抗体断片又は複合体を含む診断キット。

【請求項321】 ドキソルピシンと結合した請求項318又は319の抗体又は抗体断片又は複合体を含む組成物。

【請求項322】 請求項318又は319の抗体又は抗体断片又は複合体を含む組成物とデキストラン、HPMA、疎水性ポリマー、親油性ポリマー、及びリポソームからなる群より選択される製薬上許容しうる担体とを含む組成物。

【請求項323】 ドキソルピシン修飾リポソームと混和した請求項318又は319の抗体又は抗体断片又は複合体を含む組成物。

【発明の詳細な説明】

## 【0001】

発明の背景技術

[1.] 本発明は、がん細胞、転移性細胞、白血病細胞及び血小板などの細胞表面に存在し、かつ細胞ローリングや転移、炎症、自己免疫疾患たとえば特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、細胞接着、血栓症及び/又は再狭窄、凝集など多様な生理現象で重要な役目を果たすエピトープに関連する。本発明は該エピトープへの抗体を使用した治療診断方法及び治療診断用組成物に関連する。本発明はまた、ターゲット細胞に特異的に結合するペプチド及びポリペプチドの、ファージ提示型ライブラリー技術の援用による、組織ターゲティング及び同定という分野に関連する。さらに詳細には、該ペプチド及びポリペプチドは抗がん活性、抗転移活性、抗白血病活性、抗ウイルス活性、抗感染活性、及び/又は他疾患たとえば炎症性疾患、異常な又は病因性の細胞接着、血栓症及び/又は再狭窄を伴う疾患、異常又は病因性凝集を伴う疾患、及び自己免疫疾患、心臓血管疾患たとえば心筋梗塞、網膜疾患、硫酸化チロシン依存性タンパク質-タンパク質相互作用に起因する疾患、及び病変細胞一般に対抗する活性を有するであろう。

## 【0002】

発明の背景技術抗体、ファージ提示、及び組織ターゲティング

[2.] 治療薬の組織選択的ターゲティングは製薬産業の新分野である。ターゲティングを基礎にした新しいがん治療は副作用を緩和しながら治療の特異性と効能を強めることにより、全般的な有効性を高めることを狙っている。腫瘍関連抗原へのマウス・モノクローナル抗体(MAb)は腫瘍への毒素、放射性ヌクレオチド及び化学療法用コンジュゲートのターゲティングに使用されてきた。また分化抗原のCD19やCD20、CD22、CD25は造血組織悪性腫瘍の治療でがん特異的ターゲットとされてきた。広範囲にわたる研究にもかかわらず、このアプローチにはいくつかの限界がある。第1に選択的結合を示す好適なモノクローナル抗体の単離が困難である。第2に抗体の単離を成功させる前提条件として高い抗体免疫原性が求められる。第3に最終生成物は非ヒト配列を含むため、非ヒト物質への免疫応答(たとえばヒト抗マウス抗体-HAMA応答)を引き起こす。このHAMA応答はしばしば血清半減期を短縮する結果となり反復治療の妨げとなるため、抗体の治療上の価値を減じる。そのため、マウス起源のキメラ又はヒト化モノクローナル抗体の設計とヒト抗体の発見に関心が向けられようになった。このアプローチには既知の精製抗原だけを対象とする単一抗体種しか単離できないという限界もある。また、この方法は悪性細胞だけでなく正常細胞にも存在する細胞表面マーカーへの抗体の単離を許すという意味で非選択的である。

## 【0003】

[3.] がん治療面でのMAbの治療有効性を左右する因子はたくさんある。たとえば腫瘍細胞表面での抗原発現の特異性や発現レベル、抗原異質性、腫瘍のアクセスビリティーなどである。白血病とリンパ腫は一般に充実性腫瘍たとえばがん腫よりも抗体治療への感受性が高い。MAbは血流中で白血病及びリンパ腫細胞と急速に結合し、リンパ組織内の悪性細胞へと容易に侵入するので、リンパ腫はMAb療法の格好の候補となる。理想的なシステムは、悪性子孫細胞を産生する幹細胞の表面マーカーを認識するMAbの同定を伴う。

## 【0004】

[4.] ファージ提示型ライブラリーは単離された所定のターゲットタンパク質たとえば抗体、ホルモン及び受容体に結合するランダム単鎖Fv(scFv)の選択に使用する。さらに、一般に抗体ライブラリーの使用、特にファージ提示型scFvライブラリーの使用は、特異的な(ただし未認識、未判明の)細胞表面部分をターゲティングするための独特の分子を発見する代替手段を容易にする。

## 【0005】

[5.] 白血病、リンパ腫及び骨髄腫は骨髄及びリンパ組織に起源をもつがんであり、細胞の無制約的な増殖を伴う。急性リンパ性白血病(ALL)は特異な臨床的、免疫学的特徴によって定義される不均一な疾患である。ほとんどのB細胞ALL(B-ALL)の決定的な原因は他種ALLの場合と同様不明であるが、この疾患は多くの場合、単細胞DNAに生じた後天的遺伝子

変異に起因し、該細胞を異常化し連続的に増殖させる。B-ALL患者の予後は小児、成人どちらの場合も他の白血病患者に比して著しく悪い。

【0006】

[6.] 急性骨髄性白血病(AML)は、正常条件下で骨髄性系の最終分化細胞(赤血球、顆粒球、単球及び血小板)となる前駆細胞をもつ不均一腫瘍群である。AMLは他の腫瘍形成と同様に後天性遺伝子変異に関連し、そうした変異の結果として比較的未分化の芽細胞が正常分化骨髄性細胞に取って代わり、1つ又は複数のタイプの初期骨髄性分化を示す。AMLは一般に骨髄で、またある程度まで二次造血器でも起こる。AML患者は主に成人であり、罹患率のピーク年齢層は15~40歳であるが、小児と高齢者もAMLにかかることが判明している。ほぼすべてのAML患者は、循環未分化芽細胞の異常レベルが解消された臨床的寛解期を迎えるためには、診断後ただちに治療を受ける必要がある。

【0007】

[7.] これまでに、腫瘍細胞への細胞溶解活性を誘発するような多様なモノクローナル抗体が開発されてきた。P185増殖因子受容体(HER2)の細胞外ドメインへのヒト化モノクローナル抗体MuMab4D5はFDA(米国食品治療薬品局)の承認をすでに受け、ヒト乳がんの治療に使用されている(米国特許第5,821,337号及び5,720,954号)。この抗体は結合後、増殖因子受容体HER2に依存する腫瘍細胞の増殖を阻害することができる。加えて、リンパ腫に関連するものを含めた末梢血B細胞の急速な減少を引き起こすCD20へのキメラ抗体も最近FDAの承認を受けた(米国特許第5,843,439号)。この抗体はターゲット細胞に結合すると補体依存性溶解を招く。この抗体製品は最近承認され、現在、軽度悪性B細胞非ホジキンリンパ腫の治験に使用されている。

【0008】

[8.] 他に数種のヒト化及びキメラ抗体が開発中又は治験段階にある。また、ほとんどのタイプの骨髄性白血病細胞だけでなく正常骨髄性細胞の表面でも発現するCD33抗原と特異的に反応するヒト化Igを抗がん薬カリケアマイシン(calicheamicin)に結合したCMA-676も生まれている[Sievers et al., Blood Supplement, 308, 504a (1997)]。このコンジュゲートはMYLOTARG(登録商標)という商品名で知られ、すでにFDAの承認を受けている[Caron et al., Cancer Supplement, 73, 1049-1056 (1994)]。その細胞溶解活性に照らして追加の抗CD33抗体(HumM195)(目下治験段階にある)が、ゲロニン(gelonin)毒素を含む数種の細胞毒に結合されたり[McGraw et al., Cancer Immunol. Immunother., 39, 367-374 (1994)]、放射性同位体<sup>131</sup>I [Caron et al., Blood 83, 1760-1768 (1994)]、<sup>90</sup>Y [Jurcic et al., Blood Supplement, 92, 613a (1998)]、及び<sup>213</sup>Bi [Humm et al., Blood Supplement, 38:231P (1997)]に結合されたりしている。

【0009】

[9.] 白血球抗原CD45へのキメラ抗体(cHuLym3)はヒト白血病及びリンパ腫の治験段階にある[Sun et al., Cancer Immunol. Immunother., 48, 595-602 (2000)]。in vitroのADCC(抗体依存性細胞媒介性細胞障害)アッセイでは特異的細胞溶解が観察された[Henkart, Immunity, 1, 343-346 (1994); Squier and Cohen, Current Opin. Immunol., 6, 447-452 (1994)]。

【0010】

[10.] マウスモノクローナル抗体のヒト化やキメラ抗体の構築とは対照的に、ファージ提示技術の使用は完全ヒト配列を含むscFvの単離を可能にする。ファージ提示技術に由来するscFvクローンを土台にしたヒトTGFb2受容体への完全ヒト抗体が最近開発された。このscFvは、TGFb2の結合と競合しうる完全ヒトIgG4へと変換されると[Thompson et al., J. Immunol. Methods, 227, 17-29 (1999)]、強い抗増殖活性をもつ。この周知技術は以下の出版物にさらに詳しく記載されている: Smith, Science, 228, 1315 (1985); Scott et al., Science, 249, 386-390 (1990); Cwirla et al., PNAS, 87, 6378-6382 (1990); Devlin et al., Science, 249, 404-406 (1990); Griffiths et al., EMBO J., 13(14), 3245-3260 (1994); Bass et al., Proteins, 8, 309-314 (1990); McCafferty et al., Nature, 348, 552-554 (1990); Nissim et al., EMBO J., 13, 692-698 (1994); 米国特許

第5,427,908号、5,432,018号、5,223,409号及び5,403,384号明細書。

【0011】

単離scFv抗体分子に対応するリガンド

[11.] 血小板、フィブリノゲン、GPIb、セレクチン及びPSGL-1は各々、いくつかの病理性状態又は病態たとえば異常又は病因性炎症、異常又は病因性免疫反応、自己免疫反応、転移、異常な又は病因性の細胞接着、血栓症及び/又は再狭窄、異常又は病因性凝集で重要な役割を果たす。従って、血小板やこれらの分子と交差反応する抗体はこれらや他の病理性状態を伴う疾患及び障害の診断治療に有用であろう。

【0012】

血小板

[12.] 血小板は特性の解明が進んだ血液系成分であり、止血や血栓症及び/又は再狭窄、及び再狭窄でいくつかの重要な役割を果たす。血管の損傷は一連の連続事象を特徴とする止血過程を発動させる。血管損傷への最初の反応は血管内壁患部への血小板の接着である。次の段階では、前段階で接着した血小板の上に多層の血小板が凝集し、止血栓を形成する。この血小板の塊が血管壁をふさぐ。止血栓はフィブリンポリマーの沈着により強化される。この凝血塊は損傷が修復されて初めて分解される。

【0013】

転移における血小板の重要性

[13.] 腫瘍の転移はおそらくがん患者の生存を限定する最大の因子である。蓄積データによれば、腫瘍細胞の宿主血小板との相互作用能は不可欠の転移決定因である。Leslie O leksowicz, Z.M., "Characterization Of Tumor-Induced Platelet Aggregation: The Role Of Immunorelated GPIb and GPIIb/III a Expression By MCF-7 Breast Cancer Cells," (血小板の腫瘍凝集の解析: MCF-7乳がん細胞による免疫関連GPIb及びGPIIb/III a発現の役割) *Thrombosis Research* 79: 261-274 (1995).

【0014】

[14.] 腫瘍細胞の血小板凝集能が腫瘍細胞の転移能と相関することは証明済みであり、血小板の腫瘍凝集の阻害が転移の抑制と相関することもすでにげっ歯類モデルで示されている。すでに証明されているように、腫瘍細胞と血小板の相互作用は膜接着分子とアゴニスト分泌に関連する。腫瘍細胞株では免疫関連血小板糖タンパク質の発現がすでに確認されている。免疫関連血小板糖タンパク質GPIb、GPIIb/III a、GPIb/IX及びインテグリン $\alpha$ サブユニットが乳がん細胞株の表面で発現することは証明済みである。Oleksowicz, Z.M., "Characterization Of Tumor-Induced Platelet Aggregation: The Role Of Immunorelated GPIb and GPIIb/III a Expression By MCF-7 Breast Cancer Cells," (血小板の腫瘍凝集の解析: MCF-7乳がん細胞による免疫関連GPIb及びGPIIb/III a発現の役割) *Thrombosis Research* 79: 261-274 (1995); Kamiyama, M. et al., "Inhibition of platelet GPIIb/III a binding to fibrinogen by serum factors: studies of circulating immune complexes and platelet antibodies in patients with hemophilia, immune thrombocytopenic purpura, human immunodeficiency virus-related immune thrombocytopenic purpura, and systemic lupus erythematosus," (血小板GPIIb/III a-フィブリノゲン結合の血清因子による阻害: 血友病、免疫性血小板減少紫斑病、ヒト免疫不全ウイルス関連免疫性血小板減少紫斑病及び全身性エリテマトーデスの患者を対象とした循環免疫複合体及び血小板抗体の研究) *J. Lab Clin Med* 117(3): 209-17 (1991).

【0015】

[15.] Gasic [J.T.B. Gasic et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61: 46-52 (1968)] と共同研究者たちは、抗体誘発血小板減少症がCT26大腸腺がん、Lewis肺腺がん及びB16メラノーマによって産生される転移巣の数と体積を著しく減少させることを示した。Karparkin, S. et al., "Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction in vitro and metastasis formation in vivo," (in vitro血小板腫瘍相互作用及びin vivo転移巣形成における接着タンパク質の役割) *J. Clin. Invest.* 81 (4): 1012-9 (1998); Clezardin, P. et al., "Role of platelet membrane glycoproteins Ib/IX and IIb/III a,

and of platelet alpha-granule proteins in platelet aggregation induced by human osteosarcoma cells," (ヒト骨肉種細胞が誘発する血小板凝集における血小板膜糖タンパク質Ib/IX及びIIb/IIIaと血小板顆粒タンパク質の役割) *Cancer Res.* 53(19): 4695-700 (1993). さらに、GPIbと密接に関連しかつ不完全又は異常O-グリコシル化GPIbサブユニットに対応する単鎖ポリペプチド(60kd)がHEL細胞の表面膜上で発現することが見いだされた。Krieffler, N. et al., "Expression of platelet glycoprotein Ib alpha in HEL cells," (HEL細胞での血小板GPIbの発現) *J. Biol. Chem.* 261(34): 15854-62 (1986).

#### 【0016】

##### GPIb複合体

[16.] 止血過程の各段階は血小板表面受容体の存在を必要とする。止血で重要な受容体はGP(糖タンパク質)Ib-IX複合体(別名CD42)である。この受容体は血管内皮下層中のフォンビルブランド因子(vWF)を結合することにより損傷部位血管壁への血小板の接着(初期結合)を媒介する。この受容体はまた、止血で重要な他の2つの血小板機能すなわち(a)動脈狭窄部の高ずり応力により誘発される血小板凝集及び(b)低トロンビン濃度により誘発される血小板活性化でも決定的な役割を担う。

#### 【0017】

[17.] GPIb-IX複合体は血小板細胞膜外表面の主要成分でもある。GPIb-IX複合体は3つの膜スパンポリペプチドすなわちジスルフィド結合したGPIbの130kDa鎖と25kDa鎖、それに非共有的に結合したGPIX(22kDa)を含む。血小板膜上には4ユニットすべてが等量比で存在し細胞表面でのCD42複合体の効率的な発現と機能を実現するが、このことは細胞膜上での完全な発現には3サブユニットが複合体へと適正に構成される必要があることを示唆する。GPIbの鎖は3つの明確な構造ドメインからなる：(1)ロイシンリッチリピート配列とCys結合隣接配列とを含む球状のN末端側ペプチドドメイン；(2)高グリコシル化ムチン様マクログリコペプチドドメイン；及び(3)GPIbとのジスルフィド結合と膜貫通及び細胞質内配列を含む膜会合C末端側領域。

#### 【0018】

[18.] いくつかの証拠によれば、GPIb-IX複合体のvWF及びトロンビン結合ドメインはGPIbのN末端側の約300アミノ酸にまたがる球状ドメインに存在する。ヒト血小板GPIb-IX複合体は血小板の機能と反応性の両方を媒介する重要な膜受容体である。内皮下層vWFのGPIbによる認識は血管損傷部への血小板の接着を可能にする。さらにGPIbへのvWFの結合もまた、GPIb-IXの細胞質内ドメインの細胞骨格又はホスホリパーゼA2との相互作用を伴う場合もある血小板の活性化を誘発する。さらに、GPIbはトロンビンの高アフィニティ結合部位を含むが、トロンビンもまた、未解明の点が多い機構により、血小板の活性化を促す。

#### 【0019】

[19.] GPIbのN末端側球状ドメインは負荷電アミノ酸群を含む。いくつかの証拠によれば、GPIb-IX複合体を発現する形質転換CHO細胞と血小板GPIbでは、このドメインに含まれる3個のチロシン残基(Tyr-276、Tyr-278、Tyr-279)が硫酸化している。

#### 【0020】

##### タンパク質の硫酸化

[20.] タンパク質の硫酸化は広く見られる翻訳後修飾であり、糖鎖又はポリペプチド骨格への硫酸基の酵素的共有結合を伴う。この修飾はゴルジ体トランス層で起こるので、トランス層を横断するタンパク質だけに影響する。そうしたタンパク質の例は分泌タンパク質、顆粒へと導かれるタンパク質、及び細胞膜タンパク質の細胞外領域などである。硫酸化されることが目下判明しているアミノ酸はチロシンである。J.W. Kehoe et al., *Chemistry and Biol.* 7: R51-R61 (2000). おそらく他のアミノ酸たとえばトレオニンもまた、特に病変細胞では硫酸化されるであろう。

#### 【0021】

[21.] 多数のタンパク質がチロシン硫酸化をこうむると判明しているが、GPIbのように

単一ポリペプチド中に3個以上の硫酸化チロシンが存在するのは珍しい。GPIb (CD42)は血小板と巨核球により発現され、vWFとの結合を介して内皮下層への、また内皮下層上での、血小板の結合とローリングを媒介するが、それに加えてN末端側ドメインに多数の負電荷を含む。そうした高酸性及び親水性環境は硫酸化の必要条件であると考えられる。というのは、チロシン硫酸化酵素は酸性アミノ酸残基に隣接するチロシンを特異的に認識し硫酸化するからである。J.R. Bundgaard et al., JBC 271: 21700-21705 (1997). GPIbの酸性領域の完全硫酸化により著しく高い負電荷密度の領域(19アミノ酸の区間に13の負電荷)が出現し、そこが他タンパク質との静電的相互作用の候補部位となる。

【0022】

#### セレクトインとPSGL-1

[22.] P-、E-及びL-セレクトインは、血管内皮細胞上での白血球ローリングの媒介などを行う細胞接着分子ファミリーである。P-セレクトインは血小板の顆粒中に貯蔵され、トロンピン、ヒスタミン、ホルボールエステル又は他の刺激分子による活性化後に表面へと運ばれる。P-セレクトインは活性化内皮細胞上でも発現される。E-セレクトインは内皮細胞上で、またL-セレクトインは好中球、単球、T細胞及びB細胞上で、それぞれ発現される。

【0023】

[23.] PSGL-1 (P-Selectin Glycoprotein Ligand-1、別名CD162)はP-セレクトイン、E-セレクトイン及びL-セレクトインのムチン糖タンパク質リガンドである。PSGL-1はPACE(塩基性アミノ酸対変換酵素)切断部位をもつジスルフィド結合ホモ二量体である。PSGL-1はまた3つの潜在的なチロシン硫酸化部位とそれに続く、プロリン、セリン及びトレオニンに富む約15の十量体繰返し配列をもつ。PSGL-1の細胞外部分は3つのN結合型グリコシル化部位を含み、また多数のシアリル化、フコシル化O結合型オリゴ糖分枝鎖をもつ。K.L. Moore et al., JBC 118:455-456 (1992). 大部分のN-グリカン部位と多数のO-グリカン部位は占有されている。ヒトHL-60細胞に由来するPSGL-1のO-グリカンの構造はすでに決定されている。これらのO-グリカンのサブセットは、セレクトインへの結合に必要とされるコア-2、シアリル化及びフコシル化構造である。P-セレクトインとL-セレクトインへの結合ではPSGL-1のN末端側領域のチロシン硫酸化もまた必要とされる。さらに、おそらく翻訳後に切断されると思われるN末端側ポリペプチドが存在する。

【0024】

[24.] PSGL-1はHL60細胞では361残基を有し、うち267残基は細胞外領域に、25残基は膜貫通領域に、また69残基は細胞内領域に、それぞれ存在する。PSGL-1のコード配列は単一エキソン内にあるため選択的スプライシングは不可能なはずである。しかし、PSGL-1はHL-60細胞では、また大部分の細胞株でも、細胞外領域に存在する10残基コンセンサス配列からなる15の連続繰返し配列をもつが、多形核白血球、単球、及び他の数種の細胞株たとえば大部分の天然白血球ではこの繰返し配列が14及び16である。PSGL-1は細胞表面でジスルフィド結合ホモ二量体を形成する。V. Afshar-Kharghan et al., Blood 97:3306-3312 (2001).

【0025】

[25.] PSGL-1は好中球表面では250kDa及び160kDaの両見かけ分子質量の二量体として発現するが、HL-60表面では二量体型は~220kDaである。還元条件下で分析すると各サブユニットは分子質量が半減する。分子質量の差は、異なる数の十量体繰返し配列の存在に起因する分子の多形性によるものである。Leukocyte Typing VI. Edited by T. Kishimoto et al. (1997).

【0026】

[26.] PSGL-1はほとんどの血中白血球たとえば好中球、単球、白血球、B細胞サブセット及び諸々のT細胞の表面で発現し、P-セレクトイン上での好中球ローリングを媒介する。Leukocyte Typing VI. Edited by T. Kishimoto et al. (1997). PSGL-1はまたL-セレクトインとの結合を介して好中球-好中球相互作用を媒介し、もって炎症を媒介する可能性もある。Snapp, et al., Blood 91(1):154-64 (1998).

【0027】

[27.] PSGL-1は活性化内皮細胞上、活性化血小板上、及び他の白血球及び炎症部位上での白血球ローリングを媒介する。

【0028】

[28.] ヒトPSGL-1への市販のモノクローナル抗体(KPL1)が生成され、PSGL-1とP-セレクチンとの、またPSGL-1とL-セレクチンとの相互作用を阻害することが示された。KPL1のエピトープをマッピングによりPSGL-1のチロシン硫酸化コンセンサスモチーフ(YEYLDYD)と同一化した(Snapp et al., Blood 91 (1) : 154-164 (1998))。KPL1はこの特定エピトープだけを認識し、他の細胞たとえばB-CLL細胞、AML細胞、転移性細胞、多発性骨髄腫細胞などの表面に存在する硫酸化エピトープとは交差反応しない。

【0029】

[29.] 白血球ローリングは炎症で重要であり、血管壁上での白血球の係留とローリングには(活性化内皮細胞により、また傷害部位に動員される赤血球上で、発現される) P-セレクチンとPSGL-1の相互作用が関係している。Ramachandran et al., PNAS 98 (18):10166-71 (2001); Afshar-Kharghan et al., Blood 97(10):3306-7 (2001).

【0030】

[30.] 白血球ローリングは転移でも重要であり、内皮細胞上のP-及びE-セレクチンは転移細胞に結合して、血流から周囲組織への溢出を容易にする。

【0031】

[31.] 血小板もまた転移過程に関与する。すなわち、転移がん細胞が血流に入ると、腫瘍細胞を被覆する血小板と白血球からなる多細胞複合体が形成される。これらの複合体は、微小栓子といってもよいが、腫瘍が免疫系から逃れるのを手助けする。血小板による腫瘍細胞の被覆では血小板によるP-セレクチンの発現が必要となる。

【0032】

[32.] P-及びL-セレクチンの阻害物質であるヘパリンによる処理は腫瘍細胞-血小板相互作用を阻害する。シアリル化、フコシル化ムチンリガンドを解離するO-シアロ糖タンパク質分解酵素による腫瘍の前処理もまた、腫瘍細胞-血小板間の複合体の形成を阻害した。in vivo実験ではいずれの処理も単球の循環腫瘍細胞との会合を増進する結果となるが、これは血小板の結合を抑制すると免疫細胞による循環腫瘍細胞へのアクセスが増すことを示唆する。Varki and Varki, Braz. J. Biol. Res. 34(6): 711-7 (2001).

【0033】

[33.] PSGL-1とGPIbは構造的に類似しており、ムチン様の高グリコシル化リガンド結合領域を有する。Afshar-Kharghan et al., Blood 97(10): 3306-7 (2001).

【0034】

[34.] PSGL-1は各種の白血球すなわち単球、リンパ球、活性化末梢血T細胞、顆粒球、好酸球、血小板の表面で、またある種のCD34陽性幹細胞やB細胞サブセットの表面でも検出されている。P-セレクチンは活性化血小板及び内皮細胞の表面で発現される。P-セレクチンとPSGL-1の間の相互作用は血管壁上での白血球ローリングを促進し、また血管部位への白血球の異常集積は種々の病的炎症を招く。P-セレクチンのPSGL-1への結合ではPSGL-1上の個別チロシン硫酸の立体特異的寄与が重要である。結合には電荷もまた重要であり、NaClを(150mMから50mMへと)薄めると結合が強まった(Kd~75nM)。PSGL-1上でのチロシン硫酸化はPSGL-1のP-セレクチンへの接着を強めるが、究極の必要条件ではない。PSGL-1チロシン硫酸化はあらゆる速度でローリング接着の減速を支援し、またずっと大きい速度でのローリング接着を支援する。Rodgers SD, et al., Biophys J. 81:2001-9(2001).

【0035】

#### フィブリノゲン

[35.] 正常ヒト・フィブリノゲンには2つの型がある。すなわち、フィブリノゲン ヲメジャーとフィブリノゲン ヲマイナー変異体であり、どちらも正常個体で検出される。正常フィブリノゲンは存在量が多く(人体で検出されるフィブリノゲンの~90%)、2個の同一55kDaアルファ( )鎖、2個の同一95kDaベータ( )鎖、及び2個の同一49.5kDaガンマ( )鎖

からなる。正常変異体フィブリノゲンは存在量が少なく(人体で検出されるフィブリノゲンの~10%)、2個の同一55kDaアルファ( )鎖、2個の同一95kDaベータ( )鎖、及び1個の49.5kDaガンマ( )鎖と1個の50.5kDaガンマプライム( ' )鎖からなる。鎖と ' 鎖はどちらも同一の遺伝子がコードするが、3'末端で選択的スプライシングが起こる。正常鎖はアミノ酸1~411からなる。正常変異体 ' 鎖は427アミノ酸からなり、うちアミノ酸1~407は正常鎖と同じであり、またアミノ酸408~427はVRPEHPAET EYDSLYPEDDLである。通常、この領域はトロンビン分子が占める。

【0036】

[36.] フィブリノゲンはイオン化カルシウムの存在下にトロンビンの作用でフィブリンへと変換され、血液の凝固を引き起こす。フィブリンは血栓や急性炎症性滲出液の成分でもある。

【0037】

[37.] 血小板や(フィブリノゲン、GPIb、セレクチン、PSGL-1などのような)細胞-細胞相互作用や細胞-マトリックス相互作用、血小板-血小板相互作用、血小板-細胞相互作用、血小板-マトリックス相互作用、細胞ローリング及び接着、止血で重要な役割を果たす分子はまた、種々の病因的状态又は病態、たとえば異常又は病因的炎症、異常又は病因的免疫反応、自己免疫反応、転移、異常な又は病因的な細胞接着、血栓症及び/又は再狭窄、異常又は病因的凝集などでも重要な役割を果たす。従って血小板と、またこれらの分子と、交差反応する抗体はこれらや他の病因的状态を伴う疾患や障害の治療診断に有用であろう。従ってこれらの分子に共通するエピトープを同定し、またそれと交差反応しうる抗体を同定する必要がある。

【0038】

[38.] 抗体は断片、複合体及び多量体など多様な形態で提供してもよい。抗体断片の例は単鎖Fv (scFv)フラグメントやFabフラグメントなどである。

【0039】

[39.] scFvはフルサイズの抗体よりも小さいため、より短時間で組織に侵入し血液から排泄されることが立証済みである。Adams, G.P. et al., Br. J. Cancer 77, 1405-1412 (1988); Hudson, P.J., Curr. Opin. Immunol. 11(5), 548-557 (1999); Wu, A.M. et al., Tumor Targeting 4, 47 (1999). 従ってscFvはしばしば、放射性標識の体外排泄を速める目的で腫瘍画像診断など放射性標識を使用する診断に使用される。最近、多数のがんターゲティングscFv多量体がin vivo安定性及び効能に関する前臨床評価を受けた。Adams, G.P. et al., Br. J. Cancer 77, 1405-1412 (1988); Wu, A.M. et al., Tumor Targeting 4, 47 (1999).

【0040】

[40.] 単鎖Fv (scFv)フラグメントは抗体の重鎖可変ドメイン( $V_H$ )と軽鎖可変ドメイン( $V_L$ )からなり、両者はポリペプチドリンカーで結合されている。該リンカーは十分に長いので( $V_H$ )及び( $V_L$ )ドメインは機能的Fvドメインへと折りたたまれる。そのためscFvはそのターゲットを認識し、親抗体に優るとも劣らないアフィニティーでターゲットと結合することができる。

【0041】

[41.] 一般にscFv単量体は $V_H$ ドメインのC末端をポリペプチドリンカーで $V_L$ ドメインのN末端に結合した形に設計する。あるいはその逆に、 $V_L$ ドメインのC末端をポリペプチドリンカーで $V_H$ ドメインのN末端に結合してもよい。Power, B. et al., J. Immun. Meth. 242, 193-204 (2004). ポリペプチドリンカーは一般に長さが約15アミノ酸である。リンカーを約3~7アミノ酸に短縮すると、scFvは機能的Fvドメインへと折りたたまれなくなり、その代わりに第2のscFvと会合してダイアボディ(diabody)を形成する。リンカーの長さを3アミノ酸未満へとさらに短縮すると、scFvの会合によりリンカーの長さや、組成、Fvドメインの向きに応じて三量体、四量体が形成される。B.E. Powers, P.J. Hudson, J. Immun. Meth. 242 (2000) 193-194.

【0042】

[42.] 最近、多価抗体断片たとえばscFvの二量体、三量体及び四量体はしばしば、親抗体のターゲットへの結合よりも高いアフィニティを示すことが発見された。腫瘍ターゲットング用途ではこの高アフィニティは薬物動態の改善など潜在的利点につながる。さらに科学者たちは、白血球の係留やローリングに關与するP-セレクトインとそのリガンドPSGL-1の研究から、二量体型PSGL-1を発現する細胞のほうがこの高結合アフィニティのために、より安定的なローリング接着を示すと結論した。これらの接着はよりずり抵抗が大きく、ローリング速度の変動も少ない。Ramachandran et al., PNAS, vol. 98 (18): 10166-71 (2001).

【0043】

[43.] これら多価体の結合アフィニティの向上は診断や治療計画にも有利であろう。たとえばscFvは、ターゲット受容体に結合して「天然」リガンドの結合を阻む遮断薬として使用される場合もある。その場合には、scFvと受容体との会合アフィニティを高めて解離しにくくし、天然リガンドのターゲットへの望ましくない結合を防げるようにするのがよい。さらに、この高アフィニティはターゲット受容体が接着やローリングに關与する場合又はターゲット受容体が高ずり流動領域内の細胞たとえば血小板の表面にある場合にも有利であろう。

【0044】

[44.] 本発明の一目的は単離エピトープを提供することであるが、該エピトープは細胞ローリングや炎症、免疫反応、感染、自己免疫反応、転移、細胞接着、血栓症及び/又は再狭窄、凝集などの過程に有用であってかつ病変細胞たとえばAML細胞、B-CLL細胞、多発性骨髄腫細胞、転移性細胞などの表面に存在する多様な分子に由来する。

【0045】

[45.] 本発明の別の目的はそうした単離エピトープの使用法を提供することであるが、該方法の目的は細胞ローリングや炎症、免疫反応、感染、自己免疫反応、転移、細胞接着、血栓症及び/又は再狭窄、凝集などの過程に有用であってかつ病変細胞たとえばAML細胞、B-CLL細胞、多発性骨髄腫細胞、転移性細胞などの表面に存在する分子上のエピトープを認識しそうしたエピトープと交差反応するような抗体の開発である。

【0046】

[46.] 本発明の他の目的は、細胞ローリングや炎症、免疫反応、感染、自己免疫反応、転移、細胞接着、血栓症及び/又は再狭窄、凝集などを阻害するための薬、及び疾患たとえばAML、B-CLL、多発性骨髄腫、転移、心臓血管疾患たとえば心筋梗塞、網膜疾患、硫酸化チロシン依存性タンパク質-タンパク質相互作用に起因する疾患、及び前記のような細胞機能又は作用が重要な役割を果たす他疾患を治療するための薬の開発と提供へのそうした抗体の使用を含む。

【0047】

[47.] 個人の多様な病態たとえばAML、B-CLL、多発性骨髄腫及び転移、又は細胞ローリングや炎症、免疫反応、感染、自己免疫反応、転移、細胞接着、血栓症及び/又は再狭窄、凝集などのような細胞機能又は作用が重要な役割を果たす他疾患の診断方法に前記エピトープ及び抗体を利用することも本発明の目的である。

【0048】

[48.] 多価体の抗体、断片及び複合体の提供も本発明の目的である。より具体的には、本明細書でそれぞれダイアボディ(diabody)、トライアボディ(triobody)及びテトラボディ(tetrabody)とも呼ぶ二量体、三量体及び四量体を提供することが本発明の一目的である。

【0049】

[49.] 本明細書では本発明のこれらや他の目的について記載する。

【0050】

#### 発明の要約

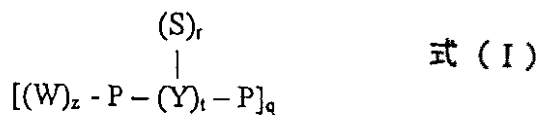
[50.] 本発明は炎症、免疫反応、転移、細胞接着、血栓症、再狭窄、凝集など多様な過程で重要な役割を果たすリガンド及び受容体上で検出されるエピトープを提供する。本発

明のエピトープは白血病/腫瘍細胞特に骨髄性白血病細胞の表面でも検出される。従って、これらのエピトープはこれらの過程の治療的媒介のための有用なターゲットである。こうしたエピトープへの抗体はがん治療薬(抗腫瘍薬、抗転移薬)や、白血病、自己免疫疾患、炎症性疾患、心臓血管疾患たとえば心筋梗塞、網膜疾患及び血小板機能異常を伴う他疾患、硫酸化チロシン依存性タンパク質-タンパク質相互作用に起因する疾患の治療薬として有用である。本発明は該抗体、該抗体を含む組成物、該抗体を使用する治療診断方法を提供する。

【0051】

[51.] 本発明は以下の式：

【化11】



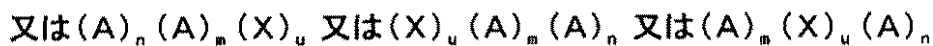
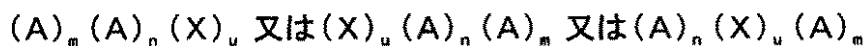
を含む単離エピトープを提供する。式中、

Wは、アスパラギン酸とグルタミン酸とを除く任意のアミノ酸であり、

Yは、硫酸化可能な任意の天然部分であり、

Pは、

【化12】



であり、

Sは、スルフェート又は硫酸化分子であり、

Xは、任意のアミノ酸であり、但し、アスパラギン酸、グルタミン酸又はチロシンを除く、

【0052】

Aは、任意の負荷電アミノ酸、もしくはロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、セリン又はグリシンであり、

qは、1~6であり、

zは、0、1又は2であり、

rは、0又は1であり、

tは、1、2又は3であり、

uは、0~2であり、

nは、0~3であり、

mは、0~3

であるが、ここで、n=0ならばm>0; m=0ならばn>0; q=1ならばr=1であり、またq>1ならば1以上のYが硫酸化している; さらに、単離エピトープにはSEQ ID NO:8又はSEQ ID NO:20を含む第1超可変領域をもつ抗体、その抗原結合性断片、又は抗体又はその結合性断片を含むその複合体が結合しうる。

【0053】

[52.] 本発明は、式(1)を含む単離エピトープであって、硫酸化部分がペプチドコンジュゲート又はグリココンジュゲート又はリポコンジュゲートもしくはそれらの複合体である単離エピトープを提供する。

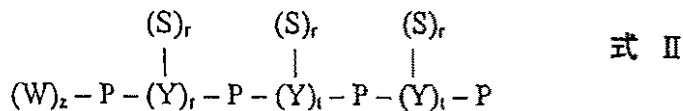
【0054】

[53.] 本発明はまた、式Iを含む単離エピトープであって、Wがグリシンであり、Yがチロシンのペプチドコンジュゲートもしくはアスパラギン、セリン又はトレオニンのグリココンジュゲートであり、Aがグルタミン酸、カルボキシグルタミン酸又はアスパラギン酸であり、qが1、2又は3である単離エピトープを提供する。これらのうちある種の実施態様ではYはチロシンのペプチドコンジュゲートであり、qは3、rは1である。

【0055】

[54.] 本発明は以下の式：

【化13】



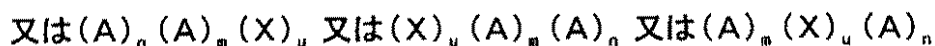
を含む単離エピトープを提供する。式中、

Wは、アスパラギン酸とグルタミン酸とを除く任意のアミノ酸であり、

Yは、硫酸化可能な任意の天然部分であり、

Pは、

【化14】



であり、

Sは、スルフェート又は硫酸化分子であり、

Xは、任意のアミノ酸であり、但し、アスパラギン酸、グルタミン酸又はチロシンを除く、

【0056】

Aは、任意の負荷電アミノ酸、もしくはロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、セリン又はグリシンであり、

zは、0、1又は2であり、

rは、0又は1であり、

tは、1、2又は3であり、

uは、0~2であり、

nは、0~3であり、

mは、0~3

であるが、ここで、n=0ならばm>0; m=0ならばn>0である; 1以上のYが硫酸化している; さらに、単離エピトープにはSEQ ID NO:8又はSEQ ID NO:20を含む第1超可変領域をもつ抗体、その抗原結合性断片、又は抗体又はその結合性断片を含むその複合体が結合しうる。

【0057】

[55.] 本発明は、式(II)を含む単離エピトープであって、硫酸化部分がペプチドコンジュゲート又はグリココンジュゲート又はリポコンジュゲートもしくはそれらの複合体である単離エピトープを提供する。

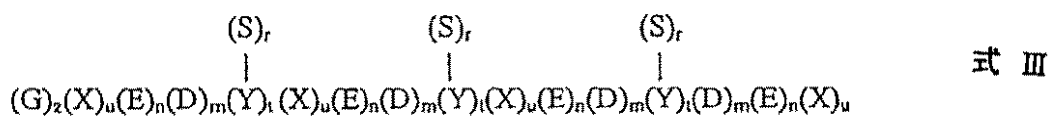
【0058】

[56.] 本発明はまた、式(II)を含む単離エピトープであって、Wがグリシンであり、Yがチロシンのペプチドコンジュゲートもしくはアスパラギン、セリン又はトレオニンのグリココンジュゲートであり、Aがグルタミン酸、カルボキシグルタミン酸又はアスパラギン酸、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、セリン又はグリシンである単離エピトープを提供する。これらのうちある種の実施態様ではYはチロシンのペプチドコンジュゲートであり、qは3、rは1である。

【0059】

[57.] 本発明は以下の式：

【化15】



を含む単離エピトープを提供する。式中、

- Gは、グリシンであり、
- Eは、グルタミン酸であり、
- Dは、アスパラギン酸であり、
- Yは、チロシンであり、
- Sは、スルフェート又は硫酸分子であり、
- Xは、前記以外の任意のアミノ酸であり、
- zは、0、1又は2であり、
- tは、1、2又は3であり、
- rは、0又は1であり、
- uは、0~2であり、
- nは、0~3であり、
- mは、0~3

であるが、ここで、1以上のYが硫酸化している；n=0ならばm>0；m=0ならばn>0；さらに、単離エピトープにはSEQ ID NO:8又はSEQ ID NO:20を含む第1超可変領域をもつ抗体、その抗原結合性断片、又は抗体又はその結合性断片を含むその複合体が結合しうる。

【0060】

[58.] 本発明は式(III)を含み、式中rが1である単離エピトープを提供する。

【0061】

[59.] 以上いずれの実施態様でも、Yは脂質、糖質、ペプチド、糖脂質、糖タンパク質、リポタンパク質、及び/又はリポ多糖分子を含んでもよい。

【0062】

[60.] 本発明はまた前記エピトープの誘導體、同族体、模倣体又は変異体を提供し、また硫酸化に加えて1以上の翻訳後修飾を受けた前記エピトープを提供する。

【0063】

[61.] 本発明は1つ又は複数の前記単離エピトープを含む組成物を提供する。前記エピトープの少なくとも一部分をコードする単離ヌクレオチドもまた提供される。

【0064】

[62.] 本発明はまた、1以上の前記エピトープと結合又は交差反応しうる抗体、その抗原

結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を提供する。

【0065】

[63.] 1以上の前記エピトープと結合又は交差反応しうる抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を生産する方法もまた提供される。該方法は次のステップを含む：(a)ファージ提示型ライブラリーを準備する、(b)前記エピトープのうちの1つを準備する、(c)該ファージ提示型ライブラリーをパニングして、該単離エピトープと結合しうるオリゴペプチド又はポリペプチドを提示するファージ粒子を選び出す、及び(d)該単離エピトープと結合しうる該オリゴペプチド又はポリペプチドを含む抗体、その結合性断片、又は該抗体又はその結合性断片を含むその複合体を生産する。

【0066】

[64.] 本発明はまた、抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体であって、SEQ ID NO: 25 [Y1 scFv]及び/又はSEQ ID NO: 203 [Y17 scFv]のscFv抗体断片の結合能を有する抗体、その断片又は複合体を提供する。

【0067】

[65.] SEQ ID NO: 8 [Y1 CDR3]又はSEQ ID NO: 20 [Y17 CDR3]を含む第1超可変領域をもつペプチド又はポリペプチドの結合能を有する抗体、抗体断片又は抗体複合体が提供される。これらのうちある種の実施態様では、該ペプチド又はポリペプチドはSEQ ID NO: 115を含む第2超可変領域及び/又はSEQ ID NO: 114を含む第3超可変領域をもつ。

【0068】

[66.] 1以上の硫酸化チロシンと2以上の酸性アミノ酸とを含むおよそ3~126アミノ酸残基の長さのペプチドエピトープ又はポリペプチドエピトープに結合しうる抗体、抗体断片又は抗体複合体が提供される。これらのうちある種の実施態様では、該エピトープはさらに1以上のロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、セリン又はグリシン残基を含む。これらのうちある種の実施態様では、2以上の酸性アミノ酸残基のうち1つ又は複数がロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、セリン又はグリシン残基に置き換わる。他実施態様では該エピトープはDYD又はEYEを含む。ある種の実施態様では該エピトープはDYD又はEYEである。さらに別の実施態様では該エピトープはDYE又はEYDを含む。

【0069】

[67.] ある種の実施態様では、本発明に基づいて提供される抗体、抗体断片及び抗体複合体は脂質、糖質、ペプチド、糖脂質、糖タンパク質、リポタンパク質及び/又はリポ多糖分子上のエピトープに結合することができる。好ましくは、本発明の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体は脂質、糖質、ペプチド、糖脂質、糖タンパク質、リポタンパク質及び/又はリポ多糖エピトープに結合することができる。数多くの実施態様では、該脂質、糖質、ペプチド、糖脂質、糖タンパク質、リポタンパク質及び/又はリポ多糖分子は1以上の硫酸化部分を含む。

【0070】

[68.] 本発明は、抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体であって、PSGL-1、フィブリノゲン、GPIb、ヘパリン、ルミカン、補体複合体4(C4)、インターインヒビター及びプロトロンピンからなる群より選択される2以上の異なる分子に、必ずしも同時にではないが、結合しうる抗体、その断片又はその複合体を提供する。また本発明の抗体、抗体断片又は複合体は、受容体エピトープが原型を保つ限り、これらのタンパク質の任意の類縁体にも結合しよう。

【0071】

[69.] ある種の好ましい実施態様では、抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体であって、PSGL-1、フィブリノゲン、GPIb、ルミカン、補体複合体4、インターインヒビター、プロトロンピン及びヘパリンからなる群より選択される2以上のタンパク質に結合しうる、また病変細胞たとえばB-CLL細胞、AML細胞、多発性骨髄腫細胞及び転移性細胞に結合しうる抗体、その断片又はその複合体が提供される。ある種の実施態様では、抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又は

その結合性断片を含むその複合体であって、PSGL-1、フィブリノゲン、GPIb、ヘパリン、ルミカン、補体複合体4(CC4)、インターインヒビター及びプロトロンビンの各々に結合しうる抗体、その断片又はその複合体が提供される。ある種の実施態様では、抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体であって、PSGL-1、フィブリノゲン、GPIb及びヘパリンの各々に結合しうる抗体、その断片又はその複合体が提供されるし、またある種の好ましい実施態様ではこれらの抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体は病変細胞たとえばB-CLL細胞、AML細胞、多発性骨髄腫細胞及び転移性細胞にも結合しうる。

【0072】

[70.] 本発明は、抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体であって、PSGL-1、フィブリノゲン、ヘパリン、GPIb、ルミカン、補体複合体4(CC4)、インターインヒビター及びプロトロンビンからなる群より選択される2以上の異なる分子に結合しうる、かつさらに糖質及び/又は脂質分子上のエピトープに結合しうる抗体、その断片又はその複合体を提供する。これらのうちある種の実施態様では、糖質及び/又は脂質分子上のエピトープは1以上の硫酸化部分を含む。

【0073】

[71.] 本発明は抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体であって、各々酸性アミノ酸群内に1つ又は複数の硫酸化チロシン残基を含む2以上のエピトープと交差反応しうる抗体、その断片又はその複合体を提供する。これらのうちある種の実施態様では、抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体は、B-CLL細胞、AML細胞、多発性骨髄腫細胞及び転移性細胞からなる群より選択される1以上の細胞型と交差反応しうる。これらのうちある種の実施態様では、抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体はPSGL-1と交差反応しうる。好ましくは、PSGL-1と交差反応しうる抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体は1以上の硫酸化チロシン残基を含むエピトープQATEYEYLDYDFLPETEに結合する。

【0074】

[72.] これらのうちある種の実施態様では、抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体はGPIb- と交差反応しうる。好ましくは、GPIb- と交差反応しうる抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体は1以上の硫酸化チロシン残基を含むエピトープDEGDTDLYDYYPEEDTEGD、1以上の硫酸化チロシン残基を含むエピトープTDLYDYYPEEDTE、1以上の硫酸化チロシン残基を含むエピトープGDEGDTDLYDYYP、1以上の硫酸化チロシン残基を含むエピトープYDYYPEE、及び/又は1以上の硫酸化チロシン残基を含むエピトープTDLYDYYPICに結合する。

【0075】

[73.] これらのうちさらなる他実施態様では、抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体はフィブリノゲン と交差反応しうる。好ましくは、フィブリノゲン と交差反応しうる抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体は1以上の硫酸化チロシン残基を含むエピトープEPHAETEYDSLYPEDに結合する。

【0076】

[74.] これらのうちさらなる他実施態様では、ヘパリンと交差反応しうる抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体が提供される。

【0077】

[75.] これらのうちさらなる他実施態様では、補体複合体4(CC4)と交差反応しうる抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体が提供される。好ましくは、CC4と交差反応しうる抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体は1以上の硫酸化チロシン残基を含むエピトープMEANE DYEDYEYDELPAKに結合する。

【0078】

[76.] 本発明はまた、前述のタンパク質の断片、類縁体、変異体及び模倣体に、エピトープが本質的に原型を保つ限りで、結合しうる抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を提供する。

【0079】

[77.] 本発明は、B-CLL細胞、AML細胞、多発性骨髄腫細胞及び転移性細胞からなる群より選択される1以上の細胞型と交差反応しうる抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を提供する。

【0080】

[78.] 本発明はまた、以下の能力を有する抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を提供する：細胞ローリング阻害；炎症阻害；自己免疫疾患阻害；血栓症阻害；再狭窄阻害；転移阻害；腫瘍細胞成長及び/又は複製阻害；腫瘍細胞死増進；白血病細胞成長及び/又は複製阻害；白血病細胞死増進；病変細胞の抗疾病薬への感受性の増進；腫瘍細胞の抗がん薬への感受性の増進；白血病細胞の抗白血病薬への感受性の増進；腫瘍患者における腫瘍細胞数増加の抑制；がん患者における腫瘍細胞数の減少；白血病患者における白血病細胞数増加の抑制；白血病患者における白血病細胞数の減少；細胞-細胞、細胞-マトリックス、血小板-マトリックス、血小板-血小板及び/又は細胞-血小板間の複合体形成の阻害；細胞-細胞、細胞-マトリックス、血小板-マトリックス、血小板-血小板及び/又は細胞-血小板間の接着の阻害；凝集。

【0081】

[79.] 着目する疾患及び/又は状態の作用を阻害し、治療し又は緩和し、もしくは着目する疾患及び/又は状態を予防する有効量の、本発明の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を含有する製剤組成物が提供される。

【0082】

[80.] 本発明は、本発明の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体の、着目する疾患及び/又は状態の作用を阻害、治療又は緩和し、もしくは着目する疾患及び/又は状態を予防するための薬の製造への使用を規定する。

【0083】

[81.] 本発明は、着目する疾患及び/又は状態の作用を阻害、治療又は緩和し、もしくは着目する疾患及び/又は状態を予防する医薬として用いる、本発明の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を提供する。

【0084】

[82.] 本発明は、着目する疾患及び/又は状態の作用を阻害、治療又は緩和し、もしくは着目する疾患及び/又は状態を予防する方法であって、そうした処置を必要とする患者に、本発明の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を有効量含有する製剤組成物を投与するステップを含む方法を提供する。

【0085】

[83.] 本発明の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体は薬剤と複合又は結合してもよい。

【0086】

[84.] 本発明は、抗がん薬、抗転移薬、抗白血病薬、抗疾病薬、抗接着薬、抗血栓薬、抗再狭窄薬、抗自己免疫薬、抗凝集薬、抗菌薬、抗ウイルス薬及び抗炎症薬からなる群より選択される薬剤と複合又は結合した抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を提供する。

【0087】

[85.] 本発明はまた、1つ又は複数の毒素、放射性同位体及び治療薬と複合又は結合した抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を提供する。

【0088】

[86.] 本発明は、1つ又は複数の薬剤との結合又は複合が可能な基剤又は担体と結合又は複合した抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複

合体を提供する。そうした基剤又は担体の例はデキストラン、親油性ポリマー、疎水性ポリマー、HPMA及びリポソームなどである。

【0089】

[87.] 本発明はまた、放射性同位体又は他の造影剤と結合又は複合した抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を提供する。本発明の抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を含む診断キットもまた提供される。

【0090】

[88.] 本発明は、アミノ酸276、278及び279のうちの1以上のアミノ酸が硫酸化されたGPIb アミノ酸配列Tyr276~Glu282を含む単離エピトープを提供する。好ましい実施態様では、該エピトープはGPIb アミノ酸283~285をさらに含む。

【0091】

[89.] 本発明はまた、アミノ酸276、278及び279のうちの1以上のアミノ酸が硫酸化されたGPIb アミノ酸配列Tyr276~Glu282を含むエピトープに結合しうる抗体、その抗原結合性断片、又は1以上の抗体又はその結合性断片を含むその複合体を提供するが、該エピトープがGPIb アミノ酸283~285をさらに含むと該結合は強化される。

【0092】

[90.] 配列YDYYPEEのエピトープを含み該エピトープ中の1以上の硫酸化チロシン残基を含む見掛け分子質量約40kDaの単離GPIb N末端側ペプチド、及びアミノ酸276、278及び279のうちの1以上のアミノ酸が硫酸化しているアミノ酸1~282からなる単離GPIb ペプチドもまた提供される。

【0093】

[91.] 本発明はまた、ヒト・モノクローナル抗体scFv Y1の軽鎖可変領域と相互反応するポリクローナル抗体、抗体断片又は抗体複合体を提供する。ある種の実施態様では、該ポリクローナル抗体、抗体断片又は抗体複合体はヒト・モノクローナル抗体Y-1の軽鎖可変領域のNdeI-EcoRI制限断片によりコードされたペプチドと交差反応する。そうしたポリクローナル抗体を含む診断キットもまた提供される。

【0094】

#### 用語の定義

[92.] 抗体(Ab)又は免疫グロブリン(Ig)は抗原に結合するタンパク質分子であり、ジスルフィド結合で連結された4個のポリペプチド鎖(2×重鎖、2×軽鎖)からなる。各ポリペプチド鎖は定常領域と可変領域をもつ。抗体又は免疫グロブリンはその軽鎖成分に応じてIgG、IgM、IgA、IgD及びIgEの5クラスにわけられる。IgGにはIgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>及びIgG<sub>4</sub>などを含むいくつかのサブクラスがある。免疫グロブリンは生体内でBリンパ球により産生され、特定の外来抗原決定基を認識し、また該抗原の排泄を容易にする。

【0095】

[93.] 抗体は抗体複合体などを含む多様な形態で生産、使用されよう。ここで使用する「抗体複合体」は1つ又は複数の抗体と別の抗体との、又は単数・複数の抗体断片との複合体、もしくは2以上の抗体断片からなる複合体を意味する。抗体断片の例はFv、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab')及びFdフラグメントなどである。

【0096】

[94.] 本明細書と特許請求の範囲で使用するFvは、ヒト抗体の重鎖可変領域とヒト抗体の軽鎖可変領域とからなる分子であって、重鎖可変領域が軽鎖可変領域へと連結、結合、融合又は共有結合もしくは会合している分子をいうが、両ヒト抗体は同じでも異なってもよい。Fvは単鎖Fv(scFv)でもジスルフィド安定化Fv(dsFv)でもよい。scFvはフレキシブルなアミノ酸ポリペプチドスペーサー又はリンカーで結合された抗体重鎖、軽鎖各々の可変ドメインからなる。リンカーは分枝型でも直鎖型でもよい。リンカーは0~15アミノ酸残基からなるのが好ましく、(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>であるのが最も好ましい。

【0097】

[95.] Fv分子自体は第1鎖と第2鎖からなり、各鎖は第1、第2及び第3超可変領域をもつ。

重鎖及び軽鎖の可変ドメイン内のこれらの超可変ループは相補性決定領域(CDR)という。重鎖、軽鎖にはそれぞれCDR1、CDR2及びCDR3領域が存在する。これらの領域は抗原結合部位を形成すると考えられており、特異的に修飾することにより結合活性を高めることができる。これらの領域のうち天然で最も可变的なのは重鎖のCDR3領域である。このCDR3領域はIg分子で最も露出した領域であると考えられており、また本明細書に記載するように、観測された選択的及び/又は特異的結合特性に主に寄与する部位である。

【0098】

[96.] Fv分子の断片は、原Fvより小さな任意の分子であって、原Fvの選択的及び/又は特異的結合特性をなお維持している分子と定義される。そうした断片の非限定的な例は、(1) Fv重鎖だけの断片を含むミニボディー(minibody)、(2)抗体重鎖可変領域の小さな部分単位を含むマイクロボディー(microbody)(PCT出願番号PCT/IL99/00581)、(3)軽鎖断片を含む類似体、及び(4)軽鎖可変領域の機能的単位を含む類似体である。

【0099】

[97.] ここで使用する「Fabフラグメント」は免疫グロブリンの一価抗原結合性断片である。Fabフラグメントは軽鎖と重鎖の一部とからなる。

【0100】

[98.]  $F(ab')_2$ フラグメントはペプシン消化によって得られる免疫グロブリンの二価抗原結合性断片である。両軽鎖と両重鎖の一部とからなる。

【0101】

[99.] Fcフラグメントは免疫グロブリンの非抗原結合性部分である。重鎖のカルボキシル末端側部分とFc受容体に対応する結合部位とを含む。

【0102】

[100.] Fdフラグメントは免疫グロブリン重鎖の可変領域と第1定常領域である。

【0103】

[101.] ポリクローナル抗体は免疫応答産物であり、多数の異なるBリンパ球により形成される。モノクローナル抗体は単一細胞に由来する。

【0104】

[102.] カセットは、ポリペプチドに適用し本発明で定義する意味では、フレームワークとして機能する所定配列の連続アミノ酸をいい、また単一単位とみなされ、そのようなものとして操作される。その一端又は両端ではアミノ酸の置換、挿入、除去又は付加が可能である。同様に、その一端又は両端では一連のアミノ酸の置換、挿入、除去又は付加が可能である。

【0105】

[103.] ここで使用する用語「エピトープ」は抗原決定基又は抗原結合部位であって、抗体、抗体断片、抗体複合体又はその結合性断片を含む複合体、又はT細胞受容体と相互作用するものをいう。エピトープという用語はここではリガンド、ドメイン及び結合領域という用語と互換的に使用している。

【0106】

[104.] 選択性はここでは、ターゲティング分子が細胞型又は細胞時期の混合物すなわち諸々の細胞型又は細胞時期から該ターゲティング分子に対し特異的である1つの細胞型又は細胞時期を選択しそれと結合する能力をいう。

【0107】

[105.] ここで使用する用語「アフィニティー」は受容体(抗体上の一結合部位など)とリガンド(抗原決定基など)の結合力の指標(結合定数)である。抗体上の単一抗原結合部位と単一エピトープの間の非共有相互作用の力の合計が該エピトープへの抗体のアフィニティーである。低アフィニティー抗体は抗原との結合が弱いため解離しやすく、高アフィニティー抗体は抗原との結合がより強いため、より長く結合状態を維持する。用語「アピディティー」は抗原-抗体相互作用の結合価を反映するものであり、アフィニティーとは異なる。

【0108】

[106.] 抗体-抗原相互作用の特異性：抗原-抗体反応は特異的であるとはいえ、ある抗原によって誘発された抗体が別の無関係の抗原と交差反応する場合もある。そうした交差反応が起こるのは、2つの異なる抗原が相同又は類似のエピトープ又はそのアンカー領域を共有する場合、又はあるエピトープに対して特異的な抗体が、類似の化学的性質をもつ無関係のエピトープに結合する場合である。

【0109】

[107.] 血小板は巨核球の円板様細胞質断片であり、骨髓腔で産生され、その後末梢血流中を循環する。血小板には血栓の形成で果たす大きな役割などを含めていくつかの生理的機能がある。血小板は中心部に顆粒を、周辺部に透明な原形質を含むが、はっきりした核はない。

【0110】

[108.] 凝集反応(agglutination)はここでは懸濁した細菌、細胞、円板又は類似サイズ他粒子が互いに接着し塊を形成する過程を意味する。この過程は沈降に類似するが、粒子は沈降の場合よりも大きいし、溶液状態ではなく懸濁状態にある。

【0111】

[109.] 凝集(aggregation)はin vitroで誘発させた血小板の塊状化及び血栓又は止血栓の形成につながる連続機構の一部としてのトロンピンとコラーゲンの塊状化を意味する。

【0112】

[110.] 保存的アミノ酸置換はペプチド、ポリペプチド又はタンパク質、もしくはそれらの断片の1個又は2個のアミノ酸を変化させることによるアミノ酸組成の変化である。これは、性質(たとえば酸性、塩基性、芳香族、サイズ、正又は負荷電、極性、非極性など)が一般に類似したアミノ酸同士の置換であり、この置換によってペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の性質(電荷、等電点、アフィニティー、アピディティー、立体構造、可溶性など)又は活性が実質的に大きく変わることはない。こうした保存的アミノ酸置換は一般に以下のアミノ酸グループ間の置換となる：

- (i) グリシン(G)、アラニン(A)、バリン(V)、ロイシン(L)及びイソロイシン(I)
- (ii) アスパラギン酸(D)及びグルタミン酸(E)
- (iii) アラニン(A)、セリン(S)及びトレオニン(T)
- (iv) ヒスチジン(H)、リシン(K)及びアルギニン(R)
- (v) アスパラギン(N)及びグルタミン(Q)
- (vi) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)及びトリプトファン(W)

【0113】

[111.] 保存的アミノ酸置換は、該分子の選択的及び/又は特異的結合特性に主に寄与する超可変領域の両側や、他の部分たとえば重鎖可変領域のカセットなどでも可能である。追加的又は代替的に、分子を再構成することで変異を起こし、フルサイズの抗体、ダイアボディー(二量体)、トリアボディー(三量体)及び/又はテトラボディー(四量体)を、又はミニボディーやマイクロボディーを、形成することもできる。

【0114】

[112.] ファスミドはプラスミドDNAをもつファージ粒子である。ファスミドは繊維状ファージ由来の複製起点たとえばm13又はfdを含むよう設計されたプラスミドベクターである。ファスミド粒子はプラスミドDNAをもつため、ファージゲノム全体を収めるにはスペースが足りない。ファージゲノムから欠落させる部分はファージ粒子のパッケージングに不可欠の情報である。従ってファージを増殖させるには、欠落パッケージング情報を補ってくれるヘルパーファージ株と一緒に所望のファージ粒子を培養する必要がある。

【0115】

[113.] プロモーターはDNA上の、RNAポリメラーゼが結合し転写を開始する領域である。

【0116】

[114.] ファージ提示型ライブラリー(ファージペプチド/抗体ライブラリー、ファージライブラリー、又はペプチド/抗体ライブラリーともいう)は、各ファージ粒子が異なるペプチド又はポリペプチド配列を提示している大個体群のファージ(一般に $10^8 \sim 10^9$ 個)を含む

。これらのペプチド又はポリペプチド断片は可変長に構築してもよい。提示のペプチド又はポリペプチドはヒト抗体重鎖又は軽鎖に由来してもよいが、それだけに限らない。

【0117】

[115.] 製剤組成物は本発明のペプチド又はポリペプチドと製薬上許容しうるその担体、賦形剤又は希釈剤とを含む製剤である。

【0118】

[116.] 薬剤はヒト、ウシ、ウマ、ブタ、マウス、イヌ、ネコ又は他の任意の温血動物を非限定的に含む哺乳動物の疾患予防、治療又は診断に有用な物質をいう。薬剤は放射性同位体、毒素、オリゴヌクレオチド、組換えタンパク質、抗体断片及び抗がん薬を含む群より選択される。そうした薬剤の非限定的な例は抗ウイルス薬たとえばアシクロビル、ガンシクロビル及びジドブジン；抗血栓/再狭窄薬たとえばシロスタゾール、ダルテパリンナトリウム、レビパリンナトリウム及びアスピリン；抗炎症薬たとえばザルトプロフェン、プラノプロフェン、ドロキシカム、acetyl salicylic 17、ジクロフェナク、イブプロフェン、デキシブプロフェン、スリダク、ナプロキセン、アムトルメチン、セレコキシブ、インドメタシン、ロフェコキシブ及びニメスリド；抗自己免疫薬たとえばレフルノマイド、デニロイキンジフチトクス(denileukin diftitox)、スブロイム(subreum)、WinRho S DF、デフィブロチド及びシクロホスファミド；及び抗接着/抗凝集薬たとえばリマプロスト、クロルクロメン及びヒアルロン酸などである。

【0119】

[117.] 抗白血病薬は抗白血病活性をもつ薬剤である。抗白血病薬はたとえば白血病細胞又は未熟な前白血病細胞の成長を阻害し又は停止させる薬剤、白血病又は前白血病細胞を傷害する薬剤、白血病又は前白血病細胞の他抗白血病薬への感受性を増進する薬剤、及び白血病細胞の転移を阻害する薬剤などである。本発明では、抗白血病薬は腫瘍の血管新生を予防、阻害、抑制し又は停止させる抗血管新生薬でもよい。

【0120】

[118.] 遺伝子の発現パターンは、たとえば多様な条件下で、特定の時期に、又は多様な組織中で産生される遺伝子産物の量を分析することによって研究することができる。遺伝子が「過剰発現」とみなされるのは遺伝子産物の量が正常対照又は非異常対照に見られる量を上回る場合である。

【0121】

[119.] 特定の細胞はその表面に特定の抗体に対応する結合部位をもつタンパク質を発現するであろうが、その結合部位は第1段階(段階I)とも呼べる状態にある細胞では隠れた形で存在しよう(たとえば立体障害を受ける、又は抗体の結合に必要なとされる機構を欠く)。段階Iはたとえば正常、健康な非異常状態であろう。エピトープは、隠れた形で存在するときは、所定の抗体によって認識されない。すなわちこのエピトープには、又は段階Iの所定の細胞には、抗体は結合しない。しかし、エピトープはたとえば自ら変異を受けることにより、又は近くの又は会合した分子が変異を受けることにより、露出することもある。変異の例は折りたたみの変化、翻訳後修飾の変化、リン脂質化の変化、硫酸化の変化、グリコシル化の変化などである。そうした変異は細胞が第2段階(段階II)とも呼べる異なる状態に移るときに起こることもある。段階IIの例は活性化、増殖、形質転換、又は悪性状態などである。変異を受けたエピトープは露出するので、抗体が結合しよう。

【0122】

[120.] ペプチド模倣体(mimetics)は小分子、ペプチド、ポリペプチド、脂質、多糖又はそれらのコンジュゲートであって、別の化学種たとえば抗体と同じ機能的作用又は活性をもつものである。

【0123】

発明の詳細な説明

[173.] 本発明では、特異的受容体が未判明又は未解明である場合に、全細胞を使用して白血病細胞表面の決定基を認識する特異的抗体を選択するようにした。さらに、多段階バイオパニング法を利用して1以上の細胞型へのパニングによりフェージを選択した。これ

は、抗原特異的ファージ抗体の選択が固定化単一抗原へのバイオパニングに大きく依存し、ターゲットとしての全細胞を使用する選択の比重が小さかった先行技術の方法と比べると著しい改善である。

【0124】

[174.] この多段階法で同定されたある種のエピトープは、好ましくは2個以上の酸性アミノ酸からなるアミノ酸群内の硫酸化部分たとえば硫酸化チロシン残基又は硫酸化糖質又は脂質部分の存在を特徴とし、また炎症、免疫反応、感染、自己免疫反応、転移、細胞接着、血栓症及び/又は再狭窄、細胞ローリング、及び凝集などの多様な過程で重要な役割を果たすリガンドや受容体の表面で検出される。この種のエピトープは病変細胞たとえばB-CLL細胞、AML細胞、多発性骨髄腫細胞、及び転移性細胞などの表面でも検出される。これらのエピトープはこれらの過程の治療的調節のターゲット及び診断方法のターゲットとして有用である。

【0125】

[175.] これらのエピトープは可変の一次アミノ酸配列を有するものの、この種の硫酸化エピトープに対して産生される抗体はしばしば複数個の分子上の複数個のこの種エピトープと、必ずしも同時ではないにせよ、結合又は交差反応する。そうした抗体は(抗腫瘍薬、抗転移薬としての)がん治療薬や、白血病、自己免疫疾患、ウイルス性疾患、異常凝集を伴う疾患、異常接着を伴う疾患、梗塞、心臓血管疾患及び炎症性疾患などの治療薬として有効である。

【0126】

[176.] 血小板に結合する抗体の同定を目的に固定化ヒト血小板スクリーニング用のファージ提示型ヒト抗体ライブラリーからヒトscFv Y1抗体を単離した。数クローン(異なるscFv抗体)を単離し解析した。そのうちの1クローン(Y1と命名)は意外にも、AML患者及びある種の他白血病患者に由来する白血病細胞と結合することが判明した。固定化血小板へのパニングにより単離された別のクローン(Y17)もまたヒト血液に結合することが判明した。

【0127】

[177.] ヒト血小板から抽出したタンパク質を、SDA-PAGE上でY1 scFv抗体とY17 scFv抗体を使用したウェスタンブロット解析にかけ、両抗体が結合する血小板表面上のエピトープの同定を試みた。この方法により、血小板上のY1 scFv及びY17 scFvエピトープはCD42複合体のサブユニットの1つ、グリコカリシンであることが判明した。

【0128】

[178.] ヒト血小板由来グリコカリシンの細胞外断片を活性化血小板から精製した。それを種々のプロテアーゼたとえばフィシン、モカラギン、カテプシンGなどで切断し、グリコカリシン分子上のY1結合エピトープの位置を正確に特定するようにした。Y1抗体を検出手段としてウェスタンブロット解析を行った。さらに、市販の抗グリコカリシン抗体類(グリコカリシンの様々なエピトープに結合することが知られている抗体類)を使用して、グリコカリシン上のY1結合エピトープを決定するためのY1抗体との競合的結合を評価した。

【0129】

[179.] その結果から、Y1のグリコカリシンへの結合ではグリコカリシンのアミノ酸272~285が大きな役割を果たしているとの結論に達した。また、E. coli由来組換えグリコカリシンのN末端側ポリペプチド(アミノ酸1~340及び1~480)はY1抗体によっては検出されなかったため、Y1のエピトープへの結合はE. coliでは起こることが知られていないグリコシル化又は硫酸化などの翻訳後修飾に依存するとの結論に達した。

【0130】

[180.] この仮説を検証するために、タンパク質からN結合型及びO結合型の糖鎖を遊離させる酵素(グリコシダーゼ)及びタンパク質から硫酸基を遊離させる酵素(スルファターゼ)で精製グリコカリシンを処理した。グリコカリシン又はグリコカリシン断片へのY1抗体の結合はグリコシダーゼの影響を受けなかった。この結果はグリコカリシンへのY1の結合に

は硫酸基が不可欠であることを示唆する。

【0131】

[181.] これらの結果をさらに検証するために、同定したエピトープ(グリコカリシンのアミノ酸272~285)を基に硫酸化及び非硫酸化合成ペプチドを調製、使用して、その存在下にグリコカリシンへのY1抗体の結合特異性を評価した(ELISA法)。硫酸化ペプチドはグリコカリシンへのY1抗体の結合を関連の非硫酸化ペプチドの場合よりも何倍も強く阻害したが、そのことは結合には硫酸化が必要であることを示唆した。

【0132】

[182.] 以上の実験結果から、Y1抗体に対応するエピトープはグリコカリシン上の、負荷電アミノ酸群が存在するアミノ酸272と285の間に位置すると結論した。

【0133】

[183.] 平行して、KG-1細胞(AML患者由来のヒト細胞株)、種々のヒト血漿由来タンパク質及び白血病患者の一次血液試料へのY1抗体の結合を調べた。

【0134】

[184.] Y1抗体は、2種類のヒト血漿由来タンパク質すなわちフィブリノゲン'と同定された分子質量~50kDのタンパク質と補体複合体4(CC4)及びヒト・ルミカンと同定された分子質量~80kDのタンパク質に比較的低いアフィニティーで結合すると判明した。これらのタンパク質は硫酸化チロシン残基とそれらに付随する一連の負荷電アミノ酸群を含んでいる。

【0135】

[185.] KG-1細胞表面のY1リガンドは、E-、L-及びP-セレクチンの受容体であるPSGL-1と同定された。PSGL-1をKG-1細胞表面のY1抗体リガンドであると同定した根拠は競合的結合測定法(種々の市販抗PSGL-1抗体の存在下にKG-1細胞へのY1抗体の結合を検定した)及びPSGL-1のN末端側部位に由来する硫酸化及び非硫酸化合成ペプチドを使用した一連の実験の結果である。PSGL-1のN末端側部位は硫酸化チロシン残基とそれらに付随する一連の負荷電アミノ酸群を含んでいる。

【0136】

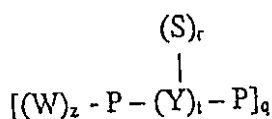
[186.] Y1抗体はいくつかの分子たとえば血小板表面のグリコカリシン、フィブリノゲン'、ヒト血漿の補体複合体4、及びKG-1細胞表面のPSGL-1分子などに結合するものの、AML患者か又は多発性骨髄腫患者に由来する一次白血病細胞へのそのアフィニティーは前述のエピトープの場合と比べて何桁も高い。さらに、市販の抗PSGL-1抗体(KPL1)は患者由来血液試料中の病変した一次白血病細胞をすべて認識するわけではない(12中7を認識)がY1抗体はそれらを特異的、選択的に認識するという事実は、原発性白血病細胞の表面にはKG-1細胞表面のエピトープとは異なる追加のY1抗体対応エピトープが存在することを示唆する。

【0137】

[187.] 本発明の硫酸化エピトープの例は式(I)、(II)及び(III)で示されるものや、その誘導体、同族体、模倣体、変異体などである。

式(I):

【化16】



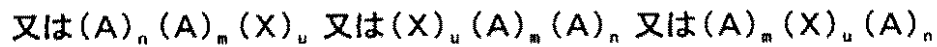
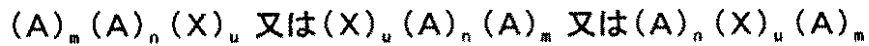
式中、

Wは、アスパラギン酸とグルタミン酸とを除く任意のアミノ酸であり、

Yは、硫酸化可能な任意の天然部分であり、

Pは、

【化17】



であり、

Sは、スルフェート又は硫酸化分子であり、

Xは、任意のアミノ酸であり、但し、アスパラギン酸、グルタミン酸又はチロシンを除く、

【0138】

Aは、任意の負荷電アミノ酸、もしくはロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、セリン又はグリシンであり、

qは、1~6であり、

zは、0、1又は2であり、

rは、0又は1であり、

tは、1、2又は3であり、

uは、0~2であり、

nは、0~3であり、

mは、0~3

であるが、ここで、n=0ならばm>0; m=0ならばn>0; q=1ならばr=1であり、またq>1ならば1以上のYが硫酸化している; さらに、単離エピトープにはSEQ ID NO:8又はSEQ ID NO:20を含む第1超可変領域をもつ抗体、その抗原結合性断片、又は抗体又はその結合性断片を含むその複合体が結合しうる。

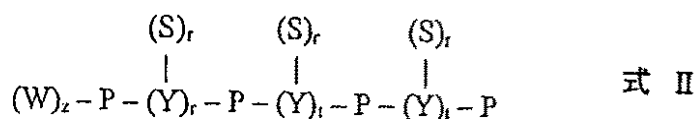
【0139】

[188.] 好ましいエピトープは式Iで示されエピトープであって、式中Wはグリシンであり、Yはチロシンのペプチドコンジュゲートもしくはアスパラギン、セリン又はトレオニンのグリココンジュゲートであり、Aはグルタミン酸、カルボキシグルタミン酸又はアスパラギン酸であり、qは1、2又は3である。ある種の実施態様ではYはチロシンのペプチドコンジュゲートであり、qは3、rは1である。

【0140】

式(II):

【化18】



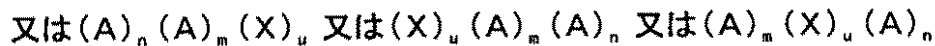
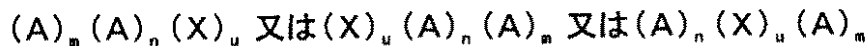
式中、

Wは、アスパラギン酸とグルタミン酸とを除く任意のアミノ酸であり、

Yは、硫酸化可能な任意の天然部分であり、

Pは、

## 【化19】



であり、

Sは、スルフェート又は硫酸化分子であり、

Xは、任意のアミノ酸であり、但し、アスパラギン酸、グルタミン酸又はチロシンを除く、

## 【0141】

Aは、任意の負荷電アミノ酸、もしくはロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、セリン又はグリシンであり、

zは、0、1又は2であり、

rは、0又は1であり、

tは、1、2又は3であり、

uは、0~2であり、

nは、0~3であり、

mは、0~3

であるが、ここで、n=0ならばm>0; m=0ならばn>0である; 1以上のYが硫酸化している; さらに、単離エピトープにはSEQ ID NO:8又はSEQ ID NO:20を含む第1超可変領域をもつ抗体、その抗原結合性断片、又は抗体又はその結合性断片を含むその複合体が結合しうる。

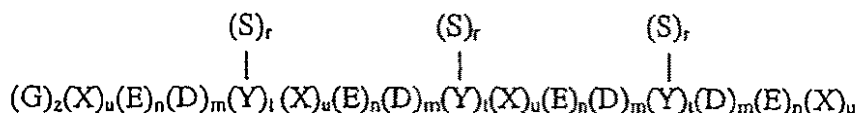
## 【0142】

[189.] 好ましいエピトープは式(II)で示されるエピトープであり、式中Wはグリシンであり、Yはチロシンのペプチドコンジュゲートもしくはアスパラギン、セリン又はトレオニンのグリココンジュゲートであり、Aはグルタミン酸、カルボキシグルタミン酸又はアスパラギン酸、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、セリン又はグリシンである。ある種の実施態様では、Yはチロシンのペプチドコンジュゲートであり、qは3、rは1である。

## 【0143】

式(III):

## 【化20】



式中、

Gは、グリシンであり、

Eは、グルタミン酸であり、

Dは、アスパラギン酸であり、

Yは、チロシンであり、

Sは、スルフェート又は硫酸分子であり、

Xは、前記以外の任意のアミノ酸であり、  
 zは、0、1又は2であり、  
 tは、1、2又は3であり、  
 rは、0又は1であり、  
 uは、0~2であり、  
 nは、0~3であり、  
 mは、0~3

であるが、ここで、1以上のYが硫酸化している；n=0ならばm>0；m=0ならばn>0である；さらに、単離エピトープにはSEQ ID NO:8又はSEQ ID NO:20を含む第1超可変領域をもつ抗体、その抗原結合性断片、又は抗体又はその結合性断片を含むその複合体が結合しうる。

【0144】

[190.] 好ましいエピトープは式(III)で示され、rが1である。

【0145】

[191.] いずれの式でも、硫酸化部分はペプチドコンジュゲート又はグリココンジュゲート又はリポコンジュゲートでよい。Yは脂質及び/又は糖質分子を含んでもよい。エピトープは硫酸化に加えて1以上の翻訳後修飾を受けてもよい。

【0146】

[192.] こうしたエピトープはGPIbやPSGL-1などのような多様な分子上で検出されるし、またある種の病変細胞たとえばB-CLL細胞、AML細胞、多発性骨髄腫細胞、転移性細胞の表面でも検出される。これらのエピトープへの結合ではチロシン及び/又は他分子の硫酸化が特に重要である。チロシン硫酸化を受けることが知られているヒトタンパク質の例は次のとおりである：

【0147】

#### ペプチド

#### 配列

トロンボモジュリン (408-426)	ECPEGYILDDGFICTDIDE
ヒトGPIb (269-287)	DEGDTDLYDYYPEEDTEGD
ヒトヘパリン補因子II (56-75)	GEEDDDYLDLEEDDDYIDIVD
ヒトフィブリノゲン (408-427)	VRPEHPAETEDYDSLYPEDOL
-2-アンチプラスミン	PPMEEDYPQFGSP
コレシストキニン (CCK)	RISDRDYMGMWDF
-2-コリオゴナドトロピン	CHCSTCYHKS-COOH
補体C4	MEANEDYEDYEDELPAK
PSGL-1	QATEYEYLDYDFLPET
血液凝固第VIII因子 (716-731)	GDYYEDSYEDISAYLL
ルミカン	GYDYDFPL

【0148】

#### Y1 - 産生と選択

[193.] 式(I)~(III)のエピトープに結合する本発明の抗体の一例は完全ヒト・モノクローナル抗体Y1である。Y1の選択、産生及び初期解析は米国特許出願第09/751,181号及び60/258,948号に詳しく記載されている。簡単に言えば、scFv抗体断片を提示するファージ提示型ライブラリーを利用してターゲティング分子を獲得、生産し、フローサイトメトリー特に蛍光活性化セルソーティング (FACS) によりターゲット細胞を認識するペプチド又はポリペプチドを提示する特異的ファージクローンを同定、単離した。ここで使用したファージ提示型ライブラリーは非免疫ドナーのヒト末梢血リンパ球から構築した。

【0149】

[194.] ファージクローンは多段階バイオパニング法により選択し同定した。バイオパニングは、タンパク質リガンド変異体を提示するファージ (ファージ提示型ライブラリー) をターゲットと共にインキュベートし、洗浄により未結合ファージを除去し、結合ファージを特異的に溶出するという方法で行った。溶出したファージは随意に増幅した後、追加の結合及び随意増幅サイクルにかけて特異的配列の集まりを濃縮し、ターゲットへの最良結

合を示す抗体断片を含むファージクローンの濃度を高めるようにした。数ラウンド後、個別ファージクローンの特性解析を行い、クローンによって提示されたペプチドの配列をファージピリオンの対応DNAの配列解析によって決定した。

【0150】

[195.] 本発明では、当初のバイオパニングステップ用に不確定エピトープを対象とする血小板のスクリーニングを行い、それに続くクローン選択は細胞表面マーカー未判明の所望のターゲット細胞(たとえばB-CLL細胞やAML細胞、多発性骨髄腫細胞、転移性細胞など)を用いて行った。

【0151】

[196.] 悪性及び病変(白血病又は骨髄腫などの)血液細胞は、通常は部分的に分化した造血前駆細胞で検出されるような細胞表面タンパク質を発現する未熟細胞として位置付けられる。従って、血小板は病変又は悪性血液細胞で発現される未熟細胞表面マーカーを同定するための格好の材料である。

【0152】

[197.] 血小板及び骨髄性白血病細胞特にAML細胞に結合するscFvクローン、Y1を選択した。Y1 scFvはSEQ ID NO: 25の配列をもつ。Y1の結合特性は主にその重鎖CDR3に由来するが、それはSEQ ID NO: 8の配列をもつ。完全Y1-IgG抗体も産生させた。

【0153】

[198.] 血小板及びヒト骨髄性白血病細胞特にAML細胞に由来する細胞株に結合する第2のscFvクローン、Y17もまた選択した。Y17 scFvはSEQ ID NO: 203の配列をもつ。Y17の結合特性は主にその重鎖CDR3に由来するが、それはSEQ ID NO: 20の配列をもつ。

【0154】

#### 抗体の産生

[199.] 本発明のCDRをカセットに挿入して抗体を産生するようにしてもよい。カセットは、ポリペプチドに適用し本発明で定義する意味では、フレームワークとして機能する所定配列の連続アミノ酸をいい、また単一単位とみなされ、そのようなものとして操作される。その一端又は両端ではアミノ酸の置換、挿入、除去又は付加が可能である。同様に、その一端又は両端では一連のアミノ酸の置換、挿入、除去又は付加が可能である。

【0155】

[200.] カセットのアミノ酸配列は表向き固定して、置換、挿入又は付加配列をきわめて可変的にしてもよい。カセットは、それぞれが最終構成体に不可欠の機能を担ういくつかのドメインからなってもよい。

【0156】

[201.] 本発明の抗体の超可変領域は本発明の抗体の抗原結合部位を形成する。抗原結合部位は抗体の結合相手となるエピトープの構造と相補的であるため、相補性決定領域(CDR)ともいう。抗体の重鎖と軽鎖には各々3つのCDRがあり、各CDRはV<sub>H</sub>ドメインとV<sub>L</sub>ドメインのストランドを結合するループ上に位置する。

【0157】

[202.] 本発明の一実施態様のカセットはN末端から順にフレームワーク領域1 (FR1)、CDR1、フレームワーク領域2 (FR2)、CDR2及びフレームワーク領域3 (FR3)を含む。

【0158】

[203.] 本発明の一実施態様では、カセット内の識別可能な領域を置き換えることができる。たとえばカセットのCDR2及びCDR1超可変領域は非保存的又は好ましくは保存的アミノ酸置換によって置き換え又は変更してもよい。もっと具体的には、SEQ ID NO: 30~113又はその断片からなる群より選択される連続アミノ酸配列のカセットのCDR2及びCDR1領域はそれぞれSEQ ID NO: 115及び114で置き換えることができる。さらに具体的には、SEQ ID NO: 30~32、35、37~39、41、43、45、46、48、51、54、57、59~68、70、71、76~85、87、98~92、94、97、99、103、106、112及び113又はその断片からなる群より選択される連続アミノ酸配列のカセットのCDR2及びCDR1領域はそれぞれSEQ ID NO: 115及び114で置き換えることができる。

## 【0159】

[204.] 本発明の好ましい実施態様では、ペプチド又はポリペプチドは重鎖と軽鎖を含み、各鎖はそれぞれCDR1、CDR2及びCDR2にほかならない第1、第2及び第3超可変領域をもつ。その結合選択性及び特異性は特にCDR3領域により、おそらくは軽鎖のCDR3により、好ましくは重鎖のCDR3領域により、また二次的には軽鎖の、また好ましくは重鎖のCDR2及びCDR2領域により、決まる。この結合選択性及び特異性は二次的には第1、第2及び/又は第3超可変領域に隣接する上流又は下流領域による影響を受ける場合もある。

## 【0160】

[205.] 好ましい実施態様ではペプチド又はポリペプチドのCDR3領域はSEQ ID NO: 8~24からなる群より選択されるアミノ酸配列をもつ。

## 【0161】

[206.] より好ましい実施態様では、重鎖のCDR3領域はSEQ ID NO: 8~24からなる群より選択されるアミノ酸配列をもち、CDR2はSEQ ID NO: 115と同一のアミノ酸配列をもち、またCDR1はSEQ ID NO: 114と同一のアミノ酸配列をもつ。

## 【0162】

[207.] 最も好ましい実施態様ではCDR3領域はSEQ ID NO:8と同一のアミノ酸配列をもつ。

## 【0163】

[208.] 本発明の好ましい実施態様は、SEQ ID NO:8と同一のCDR3配列をもつscFv及びSEQ ID NO:25と同一の完全scFv配列である。

## 【0164】

[209.] 本発明の最も好ましい実施態様では、CDR3、CDR2及びCDR1領域はそれぞれSEQ ID NO: 8、115及び114のアミノ酸配列をもつ。

## 【0165】

[210.] 本発明の一実施態様ではFvペプチドは、それ自体SEQ ID NO: 30~113からなる群より選択されるアミノ酸配列をもつカセットを含む重鎖可変領域のCDR1及びCDR2領域；SEQ ID NO:8~24からなる群より選択されるアミノ酸配列をもつ、好ましくは重鎖可変領域のCDR3領域；SEQ ID NO:117のアミノ酸配列をもつCDR3領域の隣接下流領域；SEQ ID NO:116のアミノ酸配列をもつCDR3領域の隣接上流領域；SEQ ID NO:123又は124の0~20アミノ酸残基のスペーサー；及びSEQ ID NO:7の配列をもつ軽鎖可変領域を含む。

## 【0166】

[211.] 同様に、別の実施態様では、CDR2に隣接する上流領域はSEQ ID NO: 119のアミノ酸配列をもち、CDR2に隣接する下流領域はSEQ ID NO: 118のアミノ酸配列をもち、CDR1に隣接する上流領域はSEQ ID NO: 121のアミノ酸配列をもち、またCDR1に隣接する下流領域はSEQ ID NO: 120のアミノ酸配列をもつ。

## 【0167】

[212.] 本発明の好ましい実施態様は、ペプチド又はポリペプチドであって、第2及び第3超可変領域がそれぞれCDR2及びCDR1であり、CDR3のアミノ酸配列がSEQ ID NO: 8、CDR2のアミノ酸配列がSEQ ID NO:115、CDR1のアミノ酸配列がSEQ ID NO:114、CDR3に隣接する上流領域のアミノ酸配列がSEQ ID NO:117、CDR3に隣接する下流領域のアミノ酸配列がSEQ ID NO:116、CDR2に隣接する上流領域のアミノ酸配列がSEQ ID NO:119、CDR2に隣接する下流領域のアミノ酸配列がSEQ ID NO:118、CDR1に隣接する上流領域のアミノ酸配列がSEQ ID NO:121、CDR1に隣接する下流領域のアミノ酸配列がSEQ ID NO:120であるペプチド又はポリペプチドを提供する。

## 【0168】

[213.] 本発明の別の好ましい実施態様は、随意に1つ又は複数のタグをもつFv分子であって、第1、第2及び第3超可変領域を有する第1鎖と第1、第2及び第3超可変領域を有する第2鎖とを含み、第1鎖の超可変領域の1つがSEQ ID NO: 8~24からなる群より選択されるアミノ酸配列をもち、第2鎖の超可変領域の1つがSEQ ID NO: 1~6及び125~202からなる群より選択されるアミノ酸配列をもち、また第1、第2及び第3超可変領域がそれぞれCDR3

、CDR2及びCDR1であり、さらにFvがscFv又はscFvであるFv分子を提供する。

【0169】

[214.] 本発明の別の実施態様は、ペプチド又はポリペプチドであって、(i)第1及び第2鎖が各々SEQ ID NO:8~24からなる群より選択される第1超可変領域をもつか、又は(ii)第1及び第2鎖の第1超可変領域が同一であり、SEQ ID NO:8~24からなる群より選択されるか、又は(iii)第1鎖の第1超可変領域がSEQ ID NO:8~24からなる群より選択され、第2鎖の第1超可変領域がSEQ ID NO:1~6及び125~202からなる群より選択されるか、又は(iv)第1鎖の第1超可変領域がSEQ ID NO:1~6及び125~202からなる群より選択され、第2鎖の第1超可変領域がSEQ ID NO:8~24からなる群より選択されるペプチド又はポリペプチドを提供する。

本発明のさらなる実施態様は、第1鎖の第2及び第3超可変領域がそれぞれSEQ ID NO:114及び115であるペプチド又はポリペプチドを提供する。

【0170】

[215.] 本発明のさらなる実施態様として、ここで開示し詳述する25アミノ酸残基以下のすべてのアミノ酸配列(CDR領域、CDR隣接領域など)は、その範囲内に1つ又は2つのアミノ酸置換を含むものとし、また該置換は好ましくは保存的アミノ酸置換であるものとする。本発明のさらなる実施態様として、ここで開示し詳述する25アミノ酸残基超のすべてのアミノ酸配列は、その範囲内に原配列に対して90%以上の配列類似性を有するアミノ酸配列を含むものとする[Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25, 3389-3402 (1997)]。類似又は相同アミノ酸は、類似の性質たとえば酸性、塩基性、芳香族、サイズ、正又は負荷電、極性、非極性などの性質を示す非同アミノ酸をいう。

【0171】

[216.] 百分率アミノ酸類似性又は相同性もしくは配列類似性は2つの異なるペプチド又はポリペプチドのアミノ酸配列を比較して決定する。2つの配列のアラインメントを、通常は専用のコンピュータプログラムを用いて行い、各位置のアミノ酸残基を比較する。次にアミノ酸の同一性又は相同性を決定する。次いでアルゴリズムを用いて百分率アミノ酸類似性を決定する。一般にアミノ酸配列を比較するほうが、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質分子の間の微妙な関係の検出感度が大幅に増すので好ましい。タンパク質の比較では、非同アミノ酸が類似の物理的及び/又は化学的性質をもっていると mismatches でもなおプラスの得点を生み出しかねないような保存的アミノ酸置換の存在を計算に入れることができる[Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25, 3389-3402 (1997)]。

【0172】

[217.] 本発明の一実施態様では、軽鎖、重鎖各々の3つの超可変領域は2鎖間でも、また鎖内及び/又は鎖間の3超可変領域間でも、互換可能である。

【0173】

V<sub>L</sub>(Y1由来)へのポリクローナル抗体

[218.] ヒト抗体のV<sub>L</sub>ドメイン(軽鎖可変領域)をコードするDNA断片を、Y1クローンからPCRクローニングした[同一DNA断片はNissim Iライブラリー(Nissim et al., 「免疫化学試薬としての『シングルポット』ファージ提示型ライブラリーに由来する抗体断片」 "Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents," EMBO J. 13(3): 692-698, 1994)中の他の任意のクローンから、又は同じ方法によりヒトゲノムからでさえも、得ることができる]。このPCRには次の合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いた: オリゴ5' -NdeI (TTT CAT ATG GAG CTG ACT CAG GAC CCT GCT)及びオリゴ3' -EcoRI (TTT GAA TTC CTA TTT TGC TTT TGC GGC)。PCRによる増幅(PCR条件: 94 1', 56 2', 72 2'を30回、次いで65 5')、得られたDNA断片をNdeI及びEcoRI制限酵素で消化し同じ酵素で消化済みのプラスミドにクローニングした。該プラスミドは組換えタンパク質のE. coli中での原核発現に使用されるIPTG誘導性発現ベクターである。E. coli細胞はライゲーション混合液で形質転換し、陽性クローンを前記オリゴヌクレオチドプライマー使用のPCR増幅で選択した。このプラスミドを収めた細胞を増殖させ、IPTGで発現を誘導した。IPTGによる発現誘導後の培養液1リットルから遠心で集菌

し、封入体を単離し、グアニジン-HCl+DTTに溶かし、トリス-アルギニン-EDTAを含む緩衝液で希釈して再生した。5~10 で48時間再生した後、タンパク質を含む溶液を20mMグリシンpH 9に透析、濃縮した。タンパク質を含む透析液を、イオン交換カラムHiTrapQを用いて再精製しNaClのグラジエントで溶出した。主ピークをSDA-PAGEで、またゲルろ過で解析した。当初の1リットル培養液から少なくとも10mgの精製V<sub>L</sub>が得られた。

【0174】

[219.] ウサギの免疫処理を、まずCFA(フロイント完全アジュバント)の存在下にV<sub>L</sub>(400mg)で、次いで2~4週間の間隔でIFA(フロイント不完全アジュバント)の存在下にV<sub>L</sub>(200mg)で、それぞれ行った。得られた力価は低かった(1:50~1:100)。おそらくヒト及びウサギ由来V<sub>L</sub>間の高相同性のためであろう。

scFv抗体へのポリクローナル抗体

【0175】

[220.] NissimI フェージ提示型抗体ライブラリー(Nissim et al. 前掲)に由来する2つの個別scFv抗体クローン(Y1とN14)を別々に培養した。IPTGによる発現誘導後、菌株を22で16時間増殖させた。細菌細胞の周辺質からscFv抗体断片を回収し、Protein A-Sepharoseカラムで精製した。細菌クローン培養、発現誘導プロトコール、scFv抗体断片の回収及び精製の手順はすべてHarrison J.L., Williams S.C., Winter G., and Nissim A. Methods Enzymol. 267:83-109 (1996)に従って実行した。基本的に、任意の2以上の個別scFvクローンをNissimI フェージ提示型抗体ライブラリーから選択して、Nissimライブラリー中に存在する任意の個別scFv抗体を認識する、もしくは同じV<sub>L</sub>又はその断片を含む限りで任意のIgG又はその断片を認識する、ウサギ由来ポリクローナル抗体を調製することができる。

【0176】

[221.] ウサギの免疫処理を、まずCFAの存在下に精製scFv抗体断片の1:1混合物400mgで、次いで2~4週間の間隔でIFAの存在下に同じ混合物200mgで、それぞれ行った。

【0177】

[222.] 細胞へのscFv抗体結合のフローサイトメトリー(FACS)による検出又はSDS-PAGE上での各種タンパク質画分へのscFv抗体結合のウェスタンブロット法による検出では、ポリクローナル抗scFv抗体を免疫ウサギの血清から直接、又はProtein A-Sepharoseカラムで精製後に、用いた。

【0178】

血小板上のY1結合部位の解析

[223.] 循環血小板は巨核球の周縁から放出される細胞質粒子である。血小板は止血で重要な役割を果たす。血管が損傷すると損傷組織表面に血小板が接着し、また互いに付着し合う(粘着)。この一連の事象は急速に起こり、血管損傷部に無構造の塊(一般に血小板栓又は血栓という)を形成する。この粘着現象は凝集ともいうが、種々の物質又はアゴニストたとえばコラーゲン、アデノシン二リン酸(ADP)、エピネフリン、セロトニン及びリストセチンなどによってin vitroで起こすことができる。凝集は血小板機能を調べる様々なin vitro試験の1つである。

【0179】

[224.] 先行技術中のいくつかの証拠によれば、GPIb のAsp269とAsp287の間の負荷電アミノ酸群は血小板へのウォンビルラント因子(vWF)の結合にとって重要であり、該結合自体は損傷血管への血小板の接着、動脈狭窄部位における高ずり応力によって誘発される血小板凝集、及び低濃度のトロンビンによって誘発される血小板活性化を媒介する。Ward, C.M. et al., Biochemistry 35(15): 4929-39 (1996). vWFとGPIbの相互作用は、マトリックスに結合したとき又は高ずり応力を受けたときのvWF構造の活性化事象又はコンホメーション変化に依存する。この過程はvWFに結合する特異的モジュレーターたとえばリストセチン及びボトロセチンによりin vitroでほぼ再現される。

【0180】

血小板抽出物へのY1の反応性

[225.] 血小板表面膜上のY1対応エピトープの同定には免疫ブロット法及びエンドプロテアーゼ切断法を使用した。GPIb 分子上のエンドプロテアーゼ切断部位は図1に示す。

【0181】

#### ウェスタンブロット解析

[226.] Y1 scFvをファージ抗体ライブラリーからヒト血小板へのパニングにより選択し、それが固定及び洗浄ヒト血小板に結合することを見出した。Y1の解析はELISA法とFACS法で実施した。

【0182】

[227.] Y1と結合する血小板上のエピトープを解析するために、血小板表面タンパク質を(還元、非還元の両条件下で)SDS-PAGEにより分離し、ビオチン標識Y1を使用して免疫ブロット法にかけた。この実験の結果は、Y1が還元条件下で分子質量135kDaのタンパク質と反応し、また非還元条件下で分子質量~160kDaのタンパク質と反応することを示している。これらの分子質量は還元条件下で135kDaの分子質量をもつ血小板GPIb に対応する。非還元条件下では、GPIb 鎖とジスルフィド結合したGPIb 鎖の分子質量は160kDa(図2)である。

【0183】

[228.] GPIb 鎖はGPIb 鎖とジスルフィド結合して血小板膜タンパク質GPIbを形成している。モノクローナル抗体のMCA466S (Serotec)とS.C.7071 (Santa Cruz)はそれぞれGPIb のC末端側断片とN末端に結合することが知られているが、還元及び非還元条件下でY1の反応相手となる同じ断片に結合することを見出した(S.C.は非還元条件下だけで使用した)。これらの結果は、Y1がGPIb 血小板表面タンパク質に結合することをさらに確認するものである。

【0184】

[229.] 半精製GPIb断片(グリコカリシン)をウェスタン法でさらに解析し、Y1がGPIb複合体のサブユニットに確かに結合することを確認した。

【0185】

[230.] E. coliで発現させた組換えGPIbはY1とは反応しないことがウェスタン解析で証明された。従ってY1の結合にはE. coliでは起こらない翻訳後修飾が必要となる模様である。N-又はO-グリカナーゼのいずれもKG-1へのY1結合には影響しない。しかし、Y1の結合はアリアルスルファターゼによるリガンドの処理により又はプロテアーゼにより不活性化(除去)することができる(図3)。

【0186】

#### グリコカリシン(GC) GPIb 断片上のY1エピトープ部位の定位

[231.] Y1結合部位をさらに定位するために、切断部位が判明している特異的プロテアーゼでGPIbを消化し、その断片についてY1結合試験を行った。

【0187】

#### 血小板GPIb へのY1結合へのO-シアロ糖タンパク質エンドプロテアーゼの効果

[232.] *Pasteurella haemolytica* (Cedarlan CLE 100)由来の酵素O-シアロ糖タンパク質エンドプロテアーゼはヒト血小板GPIb を選択的に切断し、しかもシアリル化したO-結合型グリカンを含むタンパク質だけを特異的に切断する。O-シアロ糖タンパク質エンドプロテアーゼはN結合型糖タンパク質又は非グリコシル化タンパク質を切断しない。この酵素は、高O-グリコシル化GPIbを切断するがGPIIb-III a又は他の血小板上受容体は切断しないことが報告されている。GPIb をO-シアロ糖タンパク質エンドプロテアーゼで切断したのは、GPIb 分子へのY1結合をさらに立証するためである。

【0188】

[233.] 免疫ブロット(図4及び5)及びFACS解析(図6)から、洗浄血小板をO-シアロ糖タンパク質エンドプロテアーゼとインキュベートするとGPIb へのモノクローナル抗体MCA466 S (Serotec)だけでなくY1もまた結合しなくなることが証明された。該エンドプロテアーゼはGPIIb/III aへの(抗CD61)モノクローナル抗体の結合には影響を及ぼさない(図4)。これらの結果は、血小板膜上のY1受容体がGPIb であることを示す追加の証拠となる。

## 【0189】

GPIbのモカラギン切断 - Y1エピトープのマッピング

[234.] モカラギン (Sigma L4515a) はコブラ毒メタロプロテアーゼであり、血小板 GPIb を残基 glu-282 と asp-283 の間の単一部位で特異的に切断して2つの安定産物すなわち上清中に放出される ~ 45kDa N末端側断片 (His1-Glu282) と膜結合 ~ 95kDa C末端側断片を生成する。

## 【0190】

[235.] 洗浄血小板をモカラギンで処理して、血小板溶解物を SDS-PAGE で電気泳動し、ニトロセルロースに転写した。モカラギン処理洗浄血小板の溶解物を Y1 によりウェスタンブロット解析すると GPIb に対応するバンド (135kDa) の消失と N末端側 ~ 45kDa 断片への Y1 の結合が見られた。GPIb の C末端側断片に対して産生させモノクローナル抗体 (MCA466S) は ~ 95kDa C末端側断片と反応し、また GPIb の N末端側断片に対して産生させたモノクローナル抗体 (S.C.7071) は Y1 が認識したのと同じ ~ 45kDa 断片と反応した (図7)。

## 【0191】

[236.] グリコカリシン (GPIb の可溶性細胞外断片) のモカラギン処理は洗浄血小板で観察されたものと類似する結果をもたらした。これは GPIb の ~ 45kDa N末端側断片への Y1 及びモノクローナル抗体 S.C.7071 の結合を示す (図8)。以上の結果は Y1 のエピトープが配列 His1-Glu282 内に含まれることを示唆する。

## 【0192】

Y17クローンの解析 - GPIbへの結合

[237.] 本発明の第2の scFv ヒト抗体断片 Y17 を Y1 の場合と同じ要領で選択し、Y1 の場合と同じ方法を用いて解析した (実施例17参照)。簡単に言えば、ファージ抗体ライブラリーから Y17 を、ヒト血小板へのパニングにより選択した。Y17 の特性解析には ELISA 法と FACS 解析を用いた。Y17 は固定、洗浄両ヒト血小板に結合することが判明した。Y17 と結合する血小板上の受容体をさらに解析するために、血小板タンパク質を SDS-PAGE で分離し、還元及び非還元条件下でビオチン標識 Y17 を使用して免疫ブロット法にかけた。その結果から、Y17 が還元条件下で見掛け分子量 135kDa のタンパク質と反応し、また非還元条件下で見掛け分子量 ~ 160kDa のタンパク質と反応することが証明された。これらの結果は血小板 GPIb に対応する。すなわち、GPIb は還元条件下で 135kDa の分子量をもち、非還元条件下で GPIb にジスルフィド結合し 160kDa 分子量をもち、GPIb の C末端側断片へのモノクローナル抗体 MCA466S (Serotec) と GPIb の N末端側断片を認識するモノクローナル抗体 S.C.7071 (Santa Cruz) は還元及び非還元条件下で Y17 と同じバンドに反応する (図2)。

## 【0193】

[238.] ウェスタンブロット解析によれば Y1 と Y17 は同じように血小板溶解物に結合する (図9)。

## 【0194】

[239.] Y1 と Y17 はまた、O-シアロ糖タンパク質エンドプロテアーゼ又はフィシンによる切断後のグリコカリシンにも同じように結合する (図5及び10)。

## 【0195】

[240.] FACS 解析によれば、Y1 は血小板と KG-1 に対して類似の結合プロフィールを示す。さらに、どちらも Raji 及び T2 細胞には結合しない。対照的に、TM1 (SEQ ID NO:209)、Y16 (SEQ ID NO:210) 及び Y45 は前述のいずれのヒト細胞株にも結合しない。

## 【0196】

[241.] これらの結果から、本発明の2つのモノクローナル抗体である Y1 と Y17 は種々の細胞でエピトープを共有すること、及びそれら以外の試験モノクローナル抗体はいずれもこのエピトープを認識しないことが明らかである。

## 【0197】

GPIbのカテプシンGによる切断 - Y1エピトープのマッピング

[242.] 好中球セリンプロテアーゼのカテプシンG (Sigma C4428) はグリコカリシンを、残基 Leu-275 と Tyr-276 の間の第1切断部位と残基 Val-296 と Lys-297 の間の第2切断部位で切

断する。グリコカリシンをカテプシンGで処理すると、2つのN末端側断片すなわち42kDaの小さなN末端側断片(His1-Leu275)と45kDaの大きなN末端側断片(His1-Val-296)、及び対応する~95kDa C末端側断片が生成する(図1)。

【0198】

[243.] グリコカリシンとカテプシンGによる消化で生成されるグリコカリシン断片とをSDS-PAGE電気泳動にかけ、ニトロセルロースに転写してウェスタンブロット法で解析した。免疫ブロットでは、Y1は大きいN末端側断片(His1-Val-275)に結合したが、小さいN末端側断片(His1-Leu275)にもC末端側断片にも結合しなかった。同様に、GPIb 上の残基Tyr276とGlu282の間のエピトープを認識するはずの市販モノクローナル抗体SZ2 (Immunotech 0719)もまた大きいN末端側断片としか反応しない(図11及び12)。

【0199】

[244.] さらに、His1とLeu275の間のエピトープを認識することが知られているモノクローナル抗体S.C.7071は両N末端側断片に結合した。Y1はS.C.7071が結合したHis1-Leu275断片には結合しない。これらの結果は、Y1のエピトープが第1及び第2カテプシンG切断部位の間に、すなわち配列Tyr276-Val296内に、又はより確からしくはアミノ酸~276-282の間に、位置することを示唆する。

【0200】

精製グリコカリシン及び洗浄血小板(WP)へのY1結合への合成部分GPIb ペプチドの効果

[245.] 精製グリコカリシンへのY1結合へのGPIb由来合成ペプチドの効果を評価するためにELISA法を実施した。加えて、洗浄血小板を使用するFACS解析も実施した。競合的結合FACS解析はGPIbのY1結合部位内の硫酸化チロシンの重要性を評価することを目的に実施した。すなわち、濃度1 $\mu$ gのY1-scFvを濃度2.5及び200 $\mu$ Mの種々のペプチドとプレインキュベートした。室温で30分間のプレインキュベーション後、洗浄血小板~ $10^7$ 個の入ったチューブに混合液を加え、ポリクローナル・ウサギ抗scFv-PEを用いて洗浄血小板へのY1結合を評価した。対照結合(Y1単独)と比較したペプチドの阻害効果を、洗浄血小板へのY1の残余結合を測定することにより評価した。使用ペプチドと結果は、それぞれ、表1と表3に記すとおりであり、同じペプチドを使用したELISA法での観測結果(表2)と類似している。いずれの評価方法でも対照Y1結合レベルは次の要領で決定した。ポリスチレン製マイクロタイターMaxiSorp(商標)プレートを(a)精製グリコカリシン又は(b)洗浄血小板でコートし、十分に洗浄後、0.5 $\mu$ g/ウェルのY1を添加した。次にプレートをウサギ抗scFvとインキュベートし、次いで抗ウサギ-HRP(西洋ワサビペルオキシダーゼ)及びHRP基質を添加した。抗ウサギ-HRPの結合レベルを発色強度によって測定した。抗ウサギ-HRPの結合レベルは抗Y1-scFvの結合レベル及びY1の結合レベルと相関する。405nmでの吸光度 $A_{405}$ を測定した。各試料は2回検定し、その平均値を求めた。

【0201】

[246.] 精製グリコカリシンへのY1結合への合成GPIb ペプチドの効果を次の要領で評価した。種々の濃度のペプチドを定量のY1と混和した。室温で30分間プレインキュベートした後に混合液を、ペプチド不存在下でのY1結合の評価に関する前述の要領で、精製グリコカリシンをコートしたポリスチレン製マイクロタイターMaxiSorpプレートを添加した。ペプチドの阻害効果は、ペプチド不存在下でのY1結合の評価に関する前述の要領で、ウサギ抗Y1scFv及び抗ウサギ-HRP抗体を用いてY1の残余結合を測定して評価した。この研究では配列268~285の多様なサブセットに対応する4つのペプチドと対照ペプチドを使用した。各ペプチドを種々の濃度すなわち200 $\mu$ M、25 $\mu$ M、2.5 $\mu$ M及び0.5 $\mu$ Mで試験した。

【0202】

[247.] 前記5ペプチドは表1のとおりである：

【0203】

【表1】

ペプチド名	説明	配列
EGR	陰性対照ペプチド	REEGRQHFFLLEGRSSYS
P-1	GPIb $\alpha$ の残基268-285	GDEGDTDLYDYYPEEDTE
P-1-S	GPIb $\alpha$ の残基268-285	GDEGDTDLY*DY*Y*PEEDTE
P-2-S	GPIb $\alpha$ の残基273-285	TDLY*DY*Y*PEEDTE
P-3-S	GPIb $\alpha$ の残基268-280	GDEGDTDLY*DY*Y*P

Y\*は硫酸化したY(チロシン)である。

【0204】

[248.] これらのアッセイから得られた結果は次の表2及び3のとおりである。

【0205】

【表2】

表2

グリコカリシンへのY1結合への合成GPIb $\alpha$ ペプチドの効果

Y1の量: 0.25  $\mu$ g/ウェル

ペプチド濃度	Y1の残余結合(基準の%)			
	200 $\mu$ M	25 $\mu$ M	2.5 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M
EGR	85	89	100	121
P-1	61	71	94	88
P-1-S	0	25	62	89
P-2-S		15	52	78
P-3-S		21	67	80

【0206】

[249.] これらの結果から明らかなように、硫酸化チロシンをもつペプチドの阻害効果は非硫酸化ペプチドのそれを大幅に上回る。この効果は用量依存的であり、より長いN'(上流)隣接配列をもつペプチドは延長C'(下流)隣接配列をもつペプチドよりも阻害効果が大い。これらの結果は、GPIb $\alpha$ へのY1結合には硫酸化チロシンが必要であり、また硫酸化領域の上流及び下流がGPIb $\alpha$ へのY1結合を強化するという結論を明らかに支持する。

【0207】

【表3】

表3

洗淨血小板へのY1結合への合成GPIIb $\alpha$ ペプチドの効果

(比較FACS解析による)

ペプチド濃度	Y1の残余結合(基準の%) (幾何平均)	
	200 $\mu$ M	2.5 $\mu$ M
EGR	119	96
P-1	87	106
P-1-S	5	41
P-2-S	7	61
P-3-S	26	82
対照-無ペプチド	114	

## 【0208】

[250.] これらの結果は、GPIIb上でのY1認識には特定領域内の硫酸化チロシンが重要であることをさらに裏付ける。概して、モカラギン及びカテプシンGによるN末端側ペプチドのタンパク質分解断片の解析結果は、GPIIb アミノ酸配列Tyr276-Glu282がY1結合のための重要なエピトープそのものであるか又はそうしたエピトープを含むことを示唆する(FIG 3)。さらなる解析からY1認識部位にはグリコカリシンの残基276-282 (硫酸化陰イオン配列)に加えて上流アミノ酸283-285も関与するらしいと判明した。

## 【0209】

## 血小板機能へのY1 scFv、Y17 scFv及びIgG Y1の生物活性

[251.] 定位実験では、Y1結合部位は血小板凝集にとって重要である トロンピン及びvWF結合部位に存在することが示唆された。そこで、洗淨血小板及び多血小板血漿(PRP)へのY1 scFv、Y17 scFv及びIgG Y1の結合を調べ、該結合の血小板凝集への効果を評価することにした。

## 【0210】

## 洗淨血小板(W.P.)凝集反応へのY1 scFv及びY17 scFvの効果

[252.] 凝集はPRP中で凝集誘発物質の存在下に測定し、凝集反応は洗淨血小板中で測定した。洗淨血小板の凝集反応へのY1(scFv)の効果を種々のY1濃度で試験した。血小板はY1 scFv、Y17 scFv、Y16 scFv又は対照TM-1 scFvとプレインキュベート(37 $^{\circ}$ C、4分間)後に血小板凝集反応及び凝集の誘発物質であるリストセチンに接触させた。

## 【0211】

[253.] この研究の結果は表4及び図15のとおりである。血小板のY1 scFv(濃度25 $\mu$ g/ml)とのプレインキュベーションはリストセチン誘発性の洗淨血小板凝集反応を阻害した。Y1濃度12.5 $\mu$ g/mlでは血小板凝集反応の部分的阻害が観測されたにすぎない。Y1濃度4 $\mu$ g/mlでは血小板凝集反応がまったく観測されなかった。これらの結果は洗淨血小板凝集反応へのY1の阻害活性が用量に依存することを示唆する。血小板の陰性対照scFv TM1とのインキュベーションはリストセチン誘発性の血小板凝集反応への効果がまったくなかった。Y1の場合と同じファージ提示ライブラリーから同じ多段階パニング法で選択した別のscFvクローンであるY17もY16も洗淨血小板凝集反応をほとんど阻害しなかった。

## 【0212】

## 【表4】

表4

scFv濃度	%阻害	%凝集反応
TM-1 scFv, 25 $\mu$ g/ml	10	90
Y1 scFv, 25 $\mu$ g/ml	77	23
Y1 scFv, 12.5 $\mu$ g/ml	33	67
Y1 scFv, 4 $\mu$ g/ml	8	92
Y17 scFv, 25 $\mu$ g/ml	15	85
Y16 scFv, 38 $\mu$ g/ml	14	86

\* リストセチン処理を基準にした100%凝集反応の校正値。

## 【 0 2 1 3 】

## 多血小板血漿 (PRP) 凝集へのY1 scFv及びY17 scFvの効果

[254.] 多血小板血漿 (PRP) 凝集へのY1 (scFv) 効果を種々のY1濃度で試験した。PRPをY1 scFv、Y17 scFv又は対照TM-1 scFvとプレインキュベート(37℃、4分間)後に血小板凝集反応及び凝集の誘発物質であるリストセチンに接触させた。PRPにscFvを添加してからリストセチンを添加すると、用量依存的な可逆的阻害効果が観測された。

## 【 0 2 1 4 】

[255.] この研究の結果は表5及び図16のとおりである。終濃度50  $\mu$ g/mlのY1は最初の4分間でPRP中での血小板のリストセチン凝集を~80%阻害した。Y1濃度25  $\mu$ g/mlでは血小板凝集の阻害があまり見られなかった。Y17は血小板凝集を阻害しなかった。濃度50  $\mu$ g/mlの陰性対照TM-1 scFvと血小板をインキュベートしてもリストセチン凝集には効果がなかった(表5)。

## 【 0 2 1 5 】

[256.] 洗浄血小板とPRPの比較からは次のことが窺えた：(1)scFv Y1はリストセチン誘発性の血小板凝集及び凝集反応への阻害効果をもつ；(2)その効果は用量依存的である；(3)阻害効果はPRP中よりも洗浄血小板中のほうが高かった；(4)PRP中では可逆的阻害効果が観測された；(5)TM1、Y16いずれのscFv抗体断片も効果がなかった；及び(6)このアッセイではY17は陰性対照である。

## 【 0 2 1 6 】

## 【 表 5 】

表5

scFv濃度	%阻害	%凝集
TM-1 scFv, 50 $\mu$ g/ml	0	100
Y1 scFv, 50 $\mu$ g/ml	80	20
Y1 scFv, 25 $\mu$ g/ml	13	87
Y17 scFv, 38 $\mu$ g/ml	0	100

\* リストセチン処理を基準にした100%凝集の校正值。

## 【 0 2 1 7 】

## 洗淨血小板(W.P.)凝集反応へのY1-IgGの効果

[257.] 全Y1-IgGはその天然構造のためにGPIb に関して2つの結合部位とFc受容体に対応する1つの結合部位をもつ。全Y1-IgGは、もしも2つのGPIb 分子に結合するとすれば、血小板を活性化し血小板凝集反応を誘発する可能性が高い。さらに、血小板はFc受容体をもつため、Y1-IgGはGPIb に結合しFc受容体にも結合することにより血小板凝集反応を誘発し、もって各Y1-IgGが血小板3個に結合することにより血小板凝集反応を引き起こすことができる。そこで、洗淨血小板凝集へのY1-IgGの効果を種々のY1-IgG濃度でリストセチンの存在及び不存在下に試験した。Y1-IgGによる血小板凝集の誘発を37 で4分間試験し、次にリストセチンを添加した。

## 【 0 2 1 8 】

[258.] その結果は表6及び図17のとおりである。Y1-IgG単独(終濃度50  $\mu$ g/ml)で通常の洗淨血小板凝集反応の~39%を誘発した。Y1-IgGによる血小板凝集反応の誘発を37 で4分間試験し、次いでリストセチンを添加した。リストセチン添加後は血小板凝集反応への追加効果がまったく見られず、通常の血小板凝集反応が観測された。しかし、血小板を濃度1  $\mu$ g/mlのY1とインキュベートしても血小板凝集反応の誘発はまったくなかった。

## 【 0 2 1 9 】

[259.] 上述の要領でGPIb (CD42)への市販の(血小板凝集反応を阻害する)モノクローナル抗体(Pharmigen)、又は対照ヒトIgG-Lambda (Sigma)を使用しても血小板凝集反応の阻害はなかった。

## 【 0 2 2 0 】

## 【表 6】

表6

IgG Ab、濃度	%阻害		%凝集反応	
	RS無添加	RS添加	RS無添加	RS添加
Y1-IgG, 50 $\mu$ g/ml	61	5	39	95
Y1-IgG, 25 $\mu$ g/ml	65	5	35	95
Y1-IgG, 12.5 $\mu$ g/ml	62	5	38	95
Y1-IgG, 3.5 $\mu$ g/ml	66	14	34	86
Y1-IgG, 1 $\mu$ g/ml	92	7	8	93
マウス抗ヒトCD42 IgG, 20 $\mu$ g/ml	99.5	100	0.5	0
対照ヒトIgG, 20 $\mu$ g/ml	99.5	25	0.5	75
対照リストセチン活性化	--	0	--	100

## 【0221】

## 多血小板血漿 (PRP) 凝集へのY1-IgGの効果

[260.] PRP凝集へのY1-IgGの効果を種々のY1-IgG濃度でリストセチンの存在及び不存在下に試験した。Y1-IgGによる血小板凝集の誘発を37℃で4分間試験し、次にリストセチンを添加した。

## 【0222】

[261.] 結果は表7及び図18のとおりである。リストセチン添加後は血小板凝集への効果が見られず、通常血小板凝集が観測された。終濃度50  $\mu$ g/mlのY1-IgGはリストセチン添加前、PRP中で血小板凝集を誘発した。濃度25  $\mu$ g/mlのY1-IgGはリストセチン添加前、血小板凝集を部分的に誘発したにすぎない。濃度10  $\mu$ g/ml、4  $\mu$ g/ml又は1  $\mu$ g/mlのY1-IgGでは血小板凝集の阻害は見られなかった。濃度20  $\mu$ g/mlで血小板凝集を阻害する市販の、GP1b (CD42)へのモノクローナル抗体 (Pharmigen)は、血小板凝集を誘発しなかった。Y1-IgGと同じ濃度の対照ヒトIgG-Lambda (Sigma)もまた血小板凝集を誘発しなかった。

## 【0223】

## 【表7】

表7

IgG、濃度	%阻害		%凝集反応	
	RS無添加	RS添加	RS無添加	RS添加
Y1-IgG, 50 $\mu$ g/ml	64	0	36	100
Y1-IgG, 25 $\mu$ g/ml	75	8	25	92
Y1-IgG, 12.5 $\mu$ g/ml	93	10	7	90
Y1-IgG, 3.5 $\mu$ g/ml	98	5	2	95
Y1-IgG, 1 $\mu$ g/ml	95.5	0.5	0.5	99.5
ヒト抗CD42 IgG, 20 $\mu$ g/ml	99.5	0.5	0.5	99.5
対照リストセチン活性化	--	0	--	100

## 【0224】

## Y1血漿可溶性リガンド及び細胞株の同定

[262.] GPIb (CD42b)への抗体は血小板溶解物とグリコカリシンを認識するが、KG-1細胞溶解物(Y1結合陽性の骨髓腫細胞株)又はRAJI細胞溶解物(KG-1細胞がY1結合陽性となる濃度でY1結合陰性であるB細胞株)を認識しない。それに対して、Y1はグリコカリシン、血小板溶解物及びKG-1細胞をいずれも認識するが、RAJI細胞抽出物を認識しない。陰性対照のscFv-181はいずれの関連タンパク質も認識しない(図20)。

## 【0225】

[263.] Y1の交差反応性のこうした独自性は、Y1とSZ2 (GPIbの硫酸化領域へのMAb)の比較分析でも明らかにされた。SZ2とは対照的に、Y1はGPIbに結合するだけでなく、以下述べるように血漿タンパク質や骨髓腫由来細胞抽出物にも結合する。

## 【0226】

## ヒト血漿中のY1リガンド

[264.] 正常血漿、白血病患者血漿のいずれでも2種類のタンパク質がY1と免疫反応した。すなわち(1)還元条件下での分子質量が $\sim 50$ kDa、非還元条件下での分子質量が $>300$ kDaであり、凝固後は血清から完全に消滅するH P-リガンド1、及び(1)還元、非還元両条件下での分子質量が $\sim 80$ kDaであり、凝固後も血清中にとどまるH P-リガンド2である。 $\sim 50$ kDaリガンドはQ-Sepharoseカラム逆相クロマトグラフィー(RP-HPLC) 2Dゲル電気泳動による精製及びペプチドマッピング後に、ヒト・フィブリノゲン鎖の正常変異体( )と同定された。その配列VRPEHPAETEYDSLYPEDDLはフィブリノゲン'中に存在するだけであるが、豊富に存在するフィブリノゲン型ではなく、また硫酸化チロシンを含むGPIb陰イオン領域に類似する。これはたぶんY1結合部位であろう。 $\sim 80$ kDaは補体複合体4(CC4)及びルミカンと同定された。それは前述のように、硫酸化チロシン残基と付随する負荷電アミノ酸群とを含む。

## 【0227】

## 一次白血病患者細胞へのY1の結合

[265.] FACS解析によれば、Y1は白血病患者細胞に選択的に結合するが、正常血液試料中の正常血液細胞と白血病患者血液試料中の正常細胞には結合しない。患者試料の解析結果をまとめると以下の表のようになる。

## 【0228】

## 【表8】

表8: 患者試料のY1結合解析の結果

疾患	陽性数	%陽性
多発性骨髄腫	16/16	100%
AML	60/75	80%
B細胞型白血病	29/43	67%

【 0 2 2 9 】

【 表 9 】

表9: B細胞型白血病

種類	起源	陽性数	%陽性	%陰性
前駆B-ALL	骨髄(BM)	3/3	100	0
B-ALL	骨髄	3/9	33	67
B-CLL	末梢血(PB)	17/23	74	26
B細胞型リンパ腫	末梢血	5/8	62	38

【 0 2 3 0 】

## 骨髄性細胞(KG-1)上のY1エピトープの解析

[266.] KG-1細胞膜からのY1エピトープの精製を目的に約250億個のKG-1細胞を回収した。KG-1膜調製品は、Y1の結合先となる少なくとも2つのサブユニットすなわち~110kDaサブユニットと~120kDaサブユニットを含んでいた。Y1は、該~110kDaサブユニットの二量体であると見られる~220kDaサブユニットにも結合する。Y1エピトープの精製はY1使用の免疫沈降法、及びRP-HPLCで行った。集めた画分のうち2 $\mu$ lはscFv Y1使用のウェスタンブロット法に、また40 $\mu$ lは銀染色に用いた。(図21)

【 0 2 3 1 】

[267.] Y1のさらなる特性解析を行った。その方法はプロテアーゼ、グリカナーゼ及びスルファターゼによる酵素的処理；Y1、抗CD42抗体、抗CD162抗体及び181の使用によるウェスタンブロット法；Y1及び抗CD162抗体の使用による免疫沈降法；Y1及び抗CD162抗体の使用によるFACS解析；及び配列解析であった。

[268.] 次の表はKG-1細胞上のY1結合部位の解析と定位を目的に実行した生化学実験のまとめである。

【 0 2 3 2 】

## SDS-PAGE還元ゲル上でのY1によるウェスタンブロット解析

【 0 2 3 3 】

【 表 1 0 】

表10

基質	処理	条件	Y1との反応性	表示の図
RP-HPLC KG-1膜画分	0-シアロ糖タンパク質エンドペプチダーゼ	37°C30分間	120kDa型とだけ反応	図22
RP-HPLC KG-1膜画分	0-シアロ糖タンパク質エンドペプチダーゼ	37°C4時間	無	図22
RP-HPLC KG-1膜画分	アリアルスルファターゼ	22°C18時間	無	図23
RP-HPLC KG-1膜画分	モカラギン	37°C7分間	無	図33
グリコカリシン(GC)	0-シアロ糖タンパク質エンドペプチダーゼ	37°C30分間	結合増進	図22
ヘパリン-BSA	アリアルスルファターゼ	22°C18時間	無処理のままのY1に結合	図23

## 【0234】

[269.] 要するに、エンドペプチダーゼで処理するとY1シグナルは切断され、検出不能になる(図22)。おそらくY1結合部位を含む画分はN'末端側にあるが、前記実験に使用した条件の下では小さすぎて検出できないのであろう。同様に、Mocarhaginによる処理後、Y1シグナルは、切断され、そして検出不能になる(図33)。これは、Y1のエピトープが、上記リガンドのN'末端上にあることを示唆するものである。さらに、硫酸基を(KG-1細胞抽出物内の)タンパク質から遊離させるものの(ヘパリン上の)糖部分からは遊離させないアリアルスルファターゼ処理で得られた結果は、Y1の認識には硫酸基が必要であるとの仮説を裏付ける(図23)。興味深いことに、0-シアロ糖タンパク質エンドペプチダーゼはGC切断産物中のY1シグナルを増強する。この処理により、Y1結合部位がC'末端側に位置するようになり、Y1結合にさらに好都合なように露出されるためと考えられる。

## 【0235】

Y1とPSLG-1抗体KPL1の相関：ウェスタンブロット解析

[270.] scFv Y1抗体及び市販抗PSGL-1モノクローナル抗体(KPL1)の、KG-1細胞由来のKPL1免疫沈降(IP)膜タンパク質への結合を評価した。Raji細胞溶解物をY1及びKPL1陰性対照として使用した。

## 【0236】

[271.] KG-1細胞の膜画分をKPL1で免疫沈降した。そのIP画分をさらにscFv Y1抗体又はKPL1で免疫沈降した。非沈降(溶出液)画分をscFv Y1又はKPL1抗体の使用によるウェスタンブロット法で解析した。

## 【0237】

[272.] 免疫沈降スキームと結果を共に図24に示す。KPL1はグリコカリシンを認識しない。しかし、scFv Y1、KPL1両抗体はKG-1細胞上の膜タンパク質を認識する。

## 【0238】

[273.] 細胞株及び一次白血球に由来する溶解物をCD162抗体で免疫沈降し、遠心分離により上清と溶出液を生成した。scFv Y1及び抗CD162抗体を使用して溶出液及び上清に含ま

れるタンパク質のウェスタンブロット解析を行った。KG-1膜調製品は、抗CD162 (PSGL-1) 抗体の結合相手となる2つのサブユニット (~ 110kDaと ~ 120kDa) を含む。それに対して、正常白血球膜調製品はもっと小さなサブユニットだけを含む。AML患者由来の膜調製品はもっと大きなサブユニットだけを含む。scFv Y1はある明確な化学種に結合するが、それは免疫沈降法の上清に存在し抗CD162抗体の結合相手とはならない(図25)。

【0239】

FACS解析

[274.] 抗PSGL-1 (抗CD162)抗体 (KPL1)の存在下でのKG-1細胞へのY1抗体 (scFv型とIgG型の両方)の結合を競合的結合測定法とFACS解析で評価した。この目的には、種々の市販抗PSGL-1抗体すなわちKPL1 (PSGL-1の硫酸化チロシンN末端側ドメインを識別する抗体)、PL1 (PSGL-1の非硫酸化N末端側ドメインを識別する抗体)及びPL2 (PSGL-1受容体の非硫酸化内側ドメインを識別する抗体)を使用した。KG-1細胞へのY1の結合を完全に阻害するのはKPL1だけであり、PL1は部分的に結合を阻害する。PL2抗体の存在下では結合阻害は見られない(図26)。Raji細胞はKPL1抗体に結合しなかった。同様に、種々の濃度の全IgG Y1はKG-1細胞へのKPL1抗体の結合を用量依存的に阻害する(図27)。同様に、KPL-1抗体はKG-1細胞への全IgG Y1の結合を用量依存的に阻害する(図28)。

【0240】

一次白血病細胞へのY1結合とKPL1結合の相関

[275.] 病変細胞へのscFv Y1抗体と抗CD162抗体の結合を解析すると、scFv Y1と抗CD162抗体は結合特性が異なることもわかる。特にヒト患者由来の前駆B-ALL、HCL、AML、B-ALL、B-CLL、未分化性白血病、B-PLL及び多発性骨髄腫の各細胞へのY1及び抗CD162の結合をFACS解析すると、2抗体は異なる結合プロフィールを示した(表F)。白血病細胞へのY1の結合は12中10試料で見られるが、抗CD162の結合は12中5試料に限られる。12中5試料はY1に結合するが、抗CD162には結合しない。従って、白血病細胞ではscFv Y1は抗CD162が認識するリガンドとは別のリガンドに結合するとの結論になる。

【0241】

【表11】

表11: 白血病試料—抗CD162対Y1の解析

患者No.	病名	白血病細胞との反応	
		scFv Y1	抗CD162
42291	前駆B-ALL	+	-
42299	HCL	-	-
42311	AML	+	+
42321	B-ALL	-	-
42323	B-CLL	+	-
42325	未分化性	+	-
42332	B-CLL	+	-
42352	B-PLL	+	+/-
42330	AML	+	+
42334	MM	+	-
42366	AML	+	+
42370	AML/ALL	+	+/-

## 【0242】

[276.] 概して、GPIb、フィブロネクチン、及びPSGL-1内の含硫酸化チロシンY1結合ドメインはそれぞれDEGDTLDLYDYYPEED TEGD (アミノ酸269-287)、EHPAETEDSLYPED (アミノ酸411-427)及びQATEYELDYDFLPETE (アミノ酸1-17)である。おそらく一次白血病細胞の表面ではY1へのアフィニティーがもっと高い追加の結合部位が発現するであろう。興味深いことに、scFv Y1と抗CD162の両方に対して陽性の血液試料はAML患者に由来するが、B細胞は抗CD162に対して陰性である。

## 【0243】

Y1への硫酸化ペプチド結合の解析

[277.] Y1へのペプチドの結合における硫酸化チロシンの存在と位置の重要性を競合的結合ELISA法で評価した。

## 【0244】

[278.] グリコカリシンをMaxiSorpプレート上に固定化した。scFv Y1を着目ペプチドと10分間、3つの異なる濃度(1 $\mu$ M、10 $\mu$ M及び100 $\mu$ M)でプレインキュベートし用量応答を調べた(表12)。プレインキュベーション後、この混合液(Y1+ペプチド)をプレートに添加し、scFv Y1のV<sub>L</sub>鎖を認識するポリクローナル・ウサギ抗V<sub>L</sub>を、次いで抗ウサギHRPを、用いてscFv Y1の結合を評価した。該ペプチドがscFv Y1に結合した混合液では、グリコカリシンへのscFv Y1の結合が対照結合に比して増大した。該ペプチドがscFv Y1に結合しなかった混合液では、グリコカリシンへのscFv Y1の結合は対照結合に比して変化しなかった。

## 【0245】

[279.] 実験は2回実施した。その結果をELISAグラフで示す(図29)。フィブリノゲン由来ペプチドは硫酸化にもかかわらずY1の結合を阻害しなかった。PSGL-1由来の非硫酸化ペプチドはグリコカリシンへのY1の結合を阻害しなかった。PSGL-1由来の硫酸化ペプチドはみなグリコカリシンへのY1の結合を阻害した。阻害効果が最も高いのはペプチドP-YYY\*及びP-YY\*Y\*であり、以下順にP-Y\*YY\*、P-YY\*Y、P-Y\*Y\*Y、P-Y\*YYと続いた。グリコカリシン由来の非硫酸化ペプチドはグリコカリシンへのY1の結合を阻害しなかったが、同じ配列でチロシンが3個とも硫酸化しているグリコカリシン由来ペプチド(G-Y\*Y\*Y\*)はP-YY\*Yと同程度の結合阻害効果があった。

## 【0246】

[280.] 従って明らかのように、すべての硫酸化ペプチドがscFv Y1に同程度に結合するわけではない。また重要なことに、これらの結果は、ペプチドP-Y\*YY及びP-YYY\*の例で明らかのように、結合に必要なのはただ1個の硫酸化チロシンであることを示す。さらに硫酸化チロシンを取り巻くアミノ酸配列もY1結合に影響することがわかる。たとえば(配列EY\*E中に1個の硫酸化チロシンを含む)P-Y\*YYは100 $\mu$ Mの濃度でようやく結合を効果的に阻害するのに対して、(配列DY\*D中に1個の硫酸化チロシンを含む)P-YYY\*は1 $\mu$ Mの濃度で結合を効果的に阻害する。

## 【0247】

## 【表12】

表12: 硫酸化ペプチド

名称	由来	配列	aa数	MW	硫酸化
F-YY	Fng- $\gamma'$ 鎖	VRPEHPAET- EYESLYPEDDL	20	2389	-
F-Y*Y*	Fng- $\gamma'$ 鎖	VRPEHPAET- EY*ESLY*PEDDL	17	2549	硫酸化
P-YYY	PSGL-1 N末 端	QATEYEYL- DYDFLPETE	17	2126	-
P-Y*YY	PSGL-1 N末 端	QATEY*EYL- DYDFLPETE	17	2206	硫酸化
P-Y*Y*Y	PSGL-1 N末 端	QATEY*EY*L- DYDFLPETE	17	2286	硫酸化
P-Y*Y*Y*	PSGL-1 N末 端	QATEY*EY*L- DY*DFLPETE	17	2286	硫酸化
P-YY*Y	PSGL-1 N末 端	QATEYEY*L- DYDFLPETE	17	2286	硫酸化
P-YY*Y*	PSGL-1 N末 端	QATEYEY*L- DY*DFLPETE	17	2286	硫酸化
P-YYY*	PSGL-1 N末 端	QATEYEYL- DY*DFLPETE	17	2286	硫酸化
G-YYY	GP1b $\alpha$	GDEGDTDLYD- YYPEEDTE	18	2126	-
G-Y*Y*Y*	GP1b $\alpha$	GDEGDTDLY*D- Y*Y*PEEDTE	18	2366	硫酸化

Y\*=硫酸化チロシン; #aa=アミノ酸数; MW=分子質量

## 【0248】

## 仮説/結論

[281.] (1) Y1は硫酸化タンパク質と糖部分の両方を認識するL-セレクチンに類似し、また硫酸化チロシンだけを認識するP-セレクチンとは異なる。従ってY1は両タンパク質の結合をめくり競合しうる。

## 【0249】

[282.] (2) 分化及び細胞増殖時の硫酸化の変異はY1結合に影響を及ぼすであろう。従ってY1はP-、L-両セレクチンとそれぞれの硫酸化リガンドへの結合をめくり競合するであろう。

## 【0250】

白血病特異的抗体の有効性を評価するための *in vivo*モデル

[283.] 免疫不全マウスとアッセイ系で2つのヒト白血病モデルを発現させた。

## 【0251】

[284.] 使用したヒト細胞株はT細胞白血病患者由来のMOLT4細胞とAML患者由来のKG-1細胞である。移植悪性細胞の同定と定量は各細胞株上の関連ヒト抗原に対して特異的な抗体を使用して行った。

## 【0252】

### T-ALL (MOLT4)モデル

[285.] T-ALLの in vivoマウスモデルには、T細胞白血病患者由来のMOLT4細胞を注射したSCIDマウス(Jackson Laboratories)を使用する。

【0253】

[286.] 一実験では、SCIDマウスをCytozen (CTX、注射用シクロホスファミド、Mead Johnson) 100mg/kgで前処置した。そして上記マウスに、 $2 \times 10^7$  MOLT-4 細胞/マウスを静脈内注射し、シクロホスファミドによる処理から5日後に、抗癌剤又はPBS(ネガティブ・コントロール動物)を、MOLT-4細胞注射から5日後以降、3回/週、静脈内注射した。35日目に、血液を動物から採取し、その動物を殺し、そして動物の肝臓を摘出し、そして計量した。未処理、PBS処理MOLT-4細胞担持動物においては、肝臓は、ひじょうに重度の腫瘍増殖を示し、そしてそのサイズは、PBS対照非感染動物に比較して2~3倍増加していた。この実験において、5つの処置群があった：

表13

1. MOLT-4細胞による注射なし、PBS処理。
2. MOLT-4注射対照、PBS処理。
3. MOLT-4注射、Y1 scFv (CONY1)、75  $\mu$ g/マウスで処理。
4. MOLT-4注射、CONY 1 scFv - ドキソルピシン、75  $\mu$ g/マウスで処理。
5. MOLT-4注射、ドキソルピシン、0.1mg/kgで処理。

【0254】

【表13】

表13

マウス頭数	接種	処置
5	PBS only	---
9	MOLT-4	---
9	MOLT-4	CONY1-Dox (2.5mg/kg)
9	MOLT-4	CONY1-Dox (2.5mg/kg)
8	MOLT-4	遊離Dox (0.1mg/kg)

【0255】

[287.] マウスは細胞接種の32日後に死に始めたので、その時点で生存マウスを犠牲にした。抗ヒトCD44-FITC及びY1-ビオチン/SAV-PE使用のフローサイトメトリーで骨髄細胞を解析した。数頭の動物に由来する血液試料を調べて血小板と白血球を計数した。肝臓を計量し、腫瘍発現の有無を調べた。他器官についても腫瘍発現の有無を調べた。

【0256】

[288.] 結果は図30~32のとおりである。MOLT-4細胞を注射したすべてのマウスの肝臓に大きな腫瘍成長(白色の瘤塊)が見られた。

【0257】

[289.] 骨髄中に検出されたMOLT-4細胞の百分率はきわめて低かった(図31)。

【0258】

[290.] 概して、これらの結果はMOLT-4モデルが白血病細胞の肝臓転移の有用モデルとして使用しうることを証明する。

【0259】

[291.] 平行して、肝組織の一部を組織学用、及びFACS解析のための細胞分離用に採取した。別の処置マウス群の生存率を対照無処置マウス群のそれと比較して記録した。

## 【0260】

[292.] 35日目の肝重量を図30に示す。図に示すように、肝重量は腫瘍マウスの陰性対照PBS注射群では対照PBS注射・非MOLT-4注射群に比してほぼ3倍に増加した。低用量Doxで処置したマウスの肝重量はPBS注射腫瘍マウスとほぼ同じであった。他方、CONY1 scFv及びCONY1 scFv-Doxコンジュゲートによる処置は肝臓の腫瘍成長を著しく阻害した(肝重量の増大がずっと小幅)。

## 【0261】

[293.] 同じSCID/MOLT-4プロトコールによる第2の実験では、次の6群を使用した：

1. MOLT-4細胞とPBSを注射しなかった。
2. MOLT-4細胞を注射しPBSで処理した。
3. MOLT-4を注射し、CONY1 scFv 75 µg/マウスで処理。
4. MOLT-4を注射し、Nissim I ライブラリー由来の非特異的scFv抗体 75 µg/マウスで処理(対照)。
5. MOLT-4を注射し、Y1-IgG 5 µg/マウスで処理。
6. 非特異的ヒトIgG, 5 µg/マウスで処置したMOLT-4群(対照)。

## 【0262】

[294.] 図34に示す結果から、CONY1 scFv又はY1 IgGによる処置は(肝重量に基づく限り)腫瘍の成長を阻害する一方で、非特異的抗体による処置はほとんど又はまったく効果がなかったことが窺える。

## 【0263】

[295.] 継続的処置を受けた3群のマウスで生存を評価したが、結果は図35のとおりである。図に示すように、CONY1 scFvで処置したマウスの生存だけが延びた。

## 【0264】

## AML KG-1モデル

[296.] ヒトAMLのin vivoマウスモデルには、ヒトAML細胞株由来のKG-1細胞を注射したSCID/NODマウス(Jackson Laboratories)を使用する。

## 【0265】

[297.] 第1の実験では、NOD/SCIDマウスをCYTOXAN(登録商標) 100mg/kgで前処置した。CYTOXAN注射の4日後、KG-1細胞を6群のマウスの尾部に静脈注射した(表14、群2及び5-9)。1群のマウス(表14、群1)にはPBSだけを注射した(対照)。

KG-1注射の14日後からマウスを次のうちいずれかで処置した：CONY1、Dox(ドキシソルピシン)、CONY1-Doxコンジュゲート又はMYLOTARG(登録商標)[MYLOTARGはカルキアマイシンにモノクローナル抗体(抗CD33抗体)を化学的に結合したコンジュゲートであり、最初の再発に見舞われた60歳以上のAML患者の治療用として最近FDAの承認がおりた]。マウスは週1回又は3回、3週間にわたり処置した。KG-1接種マウスのうち1群(群2)は無処置のままとした(表14)。他の2群(群3及び4)のマウスには、1% BSA添加の無血清RPMI中、4℃で1時間 CONY1又は181-scFv(陰性対照の非特異的抗体)とプレインキュベートしておいたKG-1細胞を注射した。抗体の使用濃度は0.25mg-scFv/10<sup>8</sup>個-細胞(75 µg/マウス)であった。プレインキュベートしたKG-1細胞はマウスに注射する前に洗浄し、RPMI中に再懸濁した。RPMIに再懸濁したKG-1細胞を75 µg-scFv/0.2ml-RPMI/マウスの濃度でマウスに注射した。群3マウスにはKG-1+CONY1を、また群4マウスにはKG-1+181-scFvをそれぞれ接種した(表14)。この処置(群3及び4)は群1-2及び5-9の接種の1日後に、すなわちCYTOXAN(商標)注射の5日後に、実施した。

## 【0266】

## 【表14】

表14

マウス頭数	群No.	接種	処置
9	1	PBS	---
11	2	KG-1	---
9	3	KG-1+Y1	---
9	4	KG-1+181	---
8	5	KG-1	CONY1 75 $\mu$ g/マウス(2.5mg/kg)、週3回
9	6	KG-1	Dox 0.1mg/kg、週3回
10	7	KG-1	Dox 5mg/kg、週1回
11	8	KG-1	CONY1-Dox 75 $\mu$ g/マウス(2.5 mg/kg)、週3回
9	9	KG-1	MYLOTARG(商標) 0.2mg/kg、週1回

## 【0267】

[298.] マウスは細胞接種の60～65日後に犠牲にした。骨髄及び血液試料をマウス抗ヒトCD34-FITC (IQP 144F) [又は抗CD44-FITC (MCA89F, Serotec)]及びY1-ビオチン/SAV-PE使用のフローサイトメトリーで解析した。マウスIgG1-FITC (IQP 191-F)をアイソタイプ対照として使用し、またマウスIgG2a-FITC (MCA 929F, Serotec)を陰性対照として使用した。フローサイトメトリーにはFACSCaliburシステムとCellQuestソフトウェア(Bectin Dickinson)を使用した。

## 【0268】

[299.] 結果はFIGS. 36及び37に示すとおりである。遊離Dox 5mg/kgで処置したKG-1細胞注射マウス(群7)10頭のうち9頭は処置開始後3週間以内に死んだ。

## 【0269】

[300.] KG-1細胞注射・無処置マウス(群2)の骨髄は骨髄細胞総数の平均30%程度のKG-1細胞を含んでいた。群2のマウスはすべて白血病を発現した。

## 【0270】

[301.] 該して、骨髄中のKG-1細胞が平均30%(FACS解析で測定)になるとほぼすべてのKG-1注射マウスが白血病を発現した。一般に移植KG-1細胞は骨髄中に限定されたが、10%未満のKG-1細胞が血液中で検出された。1例では腹膜壁に充実性腫瘍が観察された。

## 【0271】

[302.] KG-1細胞注射・遊離Dox 0.1mg/kg処置マウス(群6)は群2に比して骨髄中KG-1細胞率が統計的に有意に( $p < 0.05$ )低かった。

## 【0272】

[303.] KG-1細胞注射・CONY1-Doxコンジュゲート処置マウス(群5)は群2に比して骨髄中KG-1細胞率が低かった(16.3%対30.4%)。しかし、この差は統計的に有意とは認められなかった。実験中にCONY1-Doxがリポ多糖(LPS)で汚染されていたことが判明したためである。従って最適濃度のCONY1-Doxの使用が不可能となったので、実験終了前にこの処置を中止した。

## 【0273】

[304.] CONY1又は181-scFvとin vitroでプレインキュベートしたKG-1細胞を注射したマウス(それぞれ群3及び4)は骨髄中KG-1細胞率が有意に低かった。

## 【0274】

[305.] PBSだけを注射したマウス(陰性対照)とKG-1細胞を注射しMYLOTARG(商標)で処置したマウス(群9)はどちらも骨髄中にKG-1細胞が検出されなかった。これらの結果はこの *in vivo* モデルが有用なAMLモデルであることを証明している。

## 【0275】

[306.] 種々のマウス群の血流中の全KG-1細胞率は総じてきわめて低く、また群内の差異が大きかった。なお、MYLOTARG(商標)で処置した1頭のマウスは骨髄中ではなく血中で比較的高いKG-1細胞率を示した。

## 【0276】

[307.] マウスの骨髄中及び血流中での(KG-1起源)ヒト白血病細胞の同定をFACS解析で行ったが、これにはY1 scFv抗体と平行して市販の抗ヒトCD34又はCD44抗体を使用した。

## 【0277】

[308.] 解析1日目には、KG-1細胞だけを注射したマウス(群2)はより高い骨髄中KG-1細胞率を示し、CONY1-Doxで処置したマウス(群8)に比して著しい差が見られた。解析3日目にはこの状況が逆転し、骨髄中KG-1細胞率は群8のマウスのほうが群2のマウスよりも高くなった。これは次のような事情に起因した可能性がある: A)全身状態がより悪いマウスを1日目に選択した、B)処置終了後の期間中に群8のマウスでKG-1細胞が増殖した、及びC)各群のマウスが少なすぎて統計的に有意の結果を出せなかった。

## 【0278】

マウスにおけるCONY1の薬物動態

[309.] CONY1 scFvを<sup>125</sup>I-Bolton Hunter試薬(対リシン)で標識した。<sup>125</sup>I-Bolton Hunter試薬と4、ホウ酸緩衝液(pH9.2)中で標識させた<sup>125</sup>I-CONY1をPD-10クロマトグラフィーカラムで精製した。この放射性タンパク質を次に無標識CONY1と混合して生理食塩水中に $2.5 \times 10^6$  CPM/mlを含むCONY1濃度75 µg/mlの溶液とする。

## 【0279】

[310.] 雄のBalb-Cマウスを0.9% NaI 0.5ml/マウスの腹腔内注射で前処置した。2時間後、マウスに標識CONY1溶液0.2mlを静脈内注射した。これにより<sup>125</sup>I-CONY1の投与量は結果的に15 µg ( $2.5 \times 10^5$  CPM)/マウスとなった。

## 【0280】

[311.] 注射後、様々な時点でEDTA採血してからマウスを犠牲にし、組織を摘出した。試料及び器官は注射の5、15及び30分後と1、2、4、8及び24時間後に採取、摘出した。時点あたり2~4頭のマウスを使用した。血漿を分離し、ガンマ線放射能を測定するか又はトリクロロ酢酸(TCA)で沈殿させるかした。遠心後、TCA沈殿のガンマ線放射能を測定した。肝臓、肺、腎臓、脾臓及び骨髄試料を計量し、ガンマ放射能を測定した。血漿TCA沈殿の放射能と時間の関係をグラフにし、2コンパートメント薬物動態モデルをあてはめた。器官/組織の全放射能及び非放射能の値を計算した。その結果を図39~41に示す。

## 【0281】

[312.] 血液と血漿の放射能値を比較すると、CONY1はほぼ全量が血漿中に存在し、赤血球には接着しないことがわかった。血漿の放射能値はTCA沈殿の放射能値とほぼ同じであったが、これは両者が非分解タンパク質に関連していることを示唆する。図39は投与後の血漿中CONY1レベルを時系列に示している。その値を2コンパートメント・モデルへと統計的にあてはめると、得られた血液クリアランス半減期の値はそれぞれ35分、190分であった。

## 【0282】

[313.] 投与後の所定時点の多様な組織における放射能分布を比放射能及び全放射能として、それぞれ図40及び41に示す。ほとんどの組織では、血液との比放射能比較から明らかのように、放射能の特異的蓄積は見られなかった。やや高い値が4時間後の腎臓と4及び8時間後の骨髄で見られたが、これはおそらく分解産物の排出に関連するものであろう。

## 【0283】

[314.] 諸結果は、マウスではCONY1が35分の半減期で排出されることを示唆している。

第2コンパートメントの排出速度は重要性が小さいし、また注射物質の何らかのポリマーの存在に起因する可能性がある。体組織へのCONY1の大きな特異的取込みはなく、例外として骨髄中での若干の上昇が見られる。

【0284】

抗体及び断片の産生

[315.] 抗体、その断片、それらの構成体、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質及びそれらの断片及び構成体は原核又は真核発現系で産生させることができる。原核及び真核発現系で抗体や断片を産生させる方法は技術上周知である。

【0285】

[316.] 真核細胞系は本発明の定義及び以下の説明では、遺伝子工学的的方法により真核宿主細胞中でペプチド又はポリペプチドを産生させるための発現系をいう。真核発現系は哺乳動物系でもよいが、哺乳動物系で発現させたペプチド又はポリペプチドは精製後、哺乳動物の汚染物質を実質的に含まないのが好ましい。他の有用な真核発現系の例は酵母発現系などである。

【0286】

[317.] 本発明のペプチド又はポリペプチドを産生させる好ましい原核発現系は発現ベクター用宿主としてE. coliを使用する。E. coli系で産生されるペプチド又はポリペプチドは精製後、E. coliの汚染タンパク質を実質的に含まない。原核発現系の使用は、本発明で提供されるいくつかの、又はすべての配列のN末端側にメチオニン残基の付加を伴う場合がある。ペプチド又はポリペプチド産生後のN末端側メチオニン残基の解離によるペプチド又はポリペプチドの完全な発現は技術上周知の要領で、たとえば好適条件下でのAeromonas aminopeptidaseの使用により実現することができる。

【0287】

抗体、断片及び構成体の種類

[318.] 本発明は抗体又はその抗原結合性断片、その構成体、又は断片の構成体を提供する。本発明の抗体の例はIgG、IgA、IgD、IgE又はIgMなどである。IgGクラスはIgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>及びIgG<sub>4</sub>などのサブクラスに分かれる。

【0288】

[319.] 本発明の抗体断片の例はFv、scFv、dsFv、Fab、Fab<sub>2</sub>及びFdフラグメントなどである。もっと小さな断片たとえばFvフラグメント類の断片もまた、それらが元の抗体又はフラグメントの結合特性を保持している限り、本発明の「断片」に属する。そうした断片の例は、(1) Fv重鎖だけの断片を含むミニボディー、(2)抗体重鎖可変領域の小さな部分単位を含むマイクロボディー (PCT出願番号PCT/IL99/00581)、(3)軽鎖断片を含む類似体、及び(4)軽鎖可変領域の機能的単位を含む類似体である。構成体の例はダイアボディー、トラアボディー及びテトラボディーなどの多量体である。用語「抗体、その結合性断片、又は抗体又はその結合性断片を含む複合体」及び「抗体又は断片」は、特に断らない限り又は文脈や技術的な知見に照らして不適切でない限り、これらすべての分子だけでなく、その誘導体や同族体、模倣体、変異体をも包含する。

【0289】

[320.] 所望の結合能をもつ抗体、断片又は構成体がひとたび選択及び/又は作製されてしまえば、当業者は本明細書を手引きにして原抗体の特性を保持した構成体や断片を作製することができる。たとえば、当初に選択又は作製された抗体、断片又は構成体の所望特性を保持するような完全な抗体分子、Fvフラグメント、Fabフラグメント、Fab<sub>2</sub>フラグメント、二量体、三量体又は他の構成体などを作製することができる。

【0290】

[321.] 抗体又は断片の特性を保持しながらもアミノ酸を置換するのが望ましいのであれば、保存的アミノ酸置換という周知の技術がある。抗体又は断片には、その結合特性を変えずに治療薬又は診断薬への結合といった改変を加えてもよい。抗体又は断片には、その特異性を変えずに他の改変たとえば抗体又は断片の安定化を目的とした改変を加えてもよい。たとえばペプチド修飾、セミペプチド修飾、環状ペプチド修飾、N末端修飾、C末端修

飾、ペプチド結合修飾、骨格修飾及び残基修飾などである。また当業者は本明細書を手引きにすれば、改変抗体又は断片の結合特性が変質したかどうかを試験して評価することができる。

【0291】

[322.] 同様に、当業者は本明細書を手引きにすれば、抗体、断片又は構成体の結合特性を変えて、より望ましい特性を備えた分子を得ることもできる。たとえば望ましい特性をもつある抗体がひとたび同定されたら、ランダム又は特異的突然変異誘発法により該抗体の変異体を生成し、そこからさらに望ましい性質をもつ変異体をスクリーニングすることができる。

【0292】

[323.] 本発明の抗体及び断片はまた、その調製や識別及び診断に役立つタグを挿入又は付加した分子でもよい。該タグは後で分子から除去することができる。有用なタグの例はAU1、AU5、BTag、c-myc、FLAG、Glu-Glu、HA、His6、HSV、HTTPhh、IRS、KT3、Protein C、S-Tag(登録商標)、T7、V5及びVSV-Gなどである[Jarvik and Telmer, Ann. Rev. Gen., 32, 601-618 (1998)]。タグはc-myc又はKAKであるのが好ましい。

【0293】

多量体型の抗体

[324.] 本発明はscFv分子を含むY1又はY17ペプチド又はポリペプチドを提供する。scFvはここでは、ヒト抗体の重鎖可変領域とヒト抗体の軽鎖可変領域とからなる分子であって、重鎖可変領域が軽鎖可変領域と連結、結合、融合又は共有結合もしくは会合している分子をいうが、両ヒト抗体は同じでも異なってもよい。

【0294】

[325.] Y1及びY17 scFv構成体は、Y1及びY17抗体の1つ又は複数の超可変領域をもつscFv分子の多量体(二量体、三量体、四量体など)でもよい。scFv由来の構成体及び断片はすべて増進結合特性を維持することにより、他細胞に優先してターゲット細胞に選択的及び/又は特異的に結合する。この結合選択性及び/又は特異性は主に超可変領域によって決まる。

【0295】

[326.] 軽鎖及び重鎖の可変領域内の超可変ループは相補性決定領域(CDR)という。軽鎖と重鎖には各々CDR1、CDR2及びCDR3領域がある。これらの領域のうち最も可变的なのは重鎖のCDR3領域である。このCDR3領域はIg分子中の最も露出された領域であると考えられており、また本明細書で規定するように、観測された選択的及び/又は特異的結合特性に主に寄与する部位である。

【0296】

[327.] 本発明のY1及びY17ペプチド又はポリペプチドは多価型Fvへと折りたたまれるように構築することができる。Y1及びY17多量体型を構築した目的は、結合アフィニティー及び特異性の改善と血中半減期の延長である。

【0297】

[328.] 多価型scFvはすでにほかでも作製されている。まず2つのscFvをリンカーで連結するというアプローチがある。別のアプローチでは2つのscFvをジスルフィド結合で連結する。二量体又は三量体型のFvを作製する最も単純なアプローチはHolliger et al., PNAS, 90, 6444-6448 (1993)及びA. Kortt et al., Protein Eng., 10, 423-433 (1997)が報告している。そうした方法の1つは、scFvのC末端にFOS及びJUNタンパク質領域を付加して両者の間にロイジンジッパーを形成することによりscFv二量体を作製するというものである。Kostelny SA et al., J. Immunol. 1992 Mar 1, 148(5):1547-53; De Kruif et al., J. Biol. Chem. 1996 Mar 29, 271 (13):7630-4. 別の方法は、scFvのC末端にストレプトアビジン・コード配列を付加して四量体を作製するというものである。ストレプトアビジンは4つのサブユニットからなるため、scFv-ストレプトアビジンが折りたたまれるとき4つのサブユニットはそれに順応して変化し四量体を形成する。Kipriyanov SM et al., Hum Antibodies Hybridomas, 1995, 6(3):93-101. さらに別の方法では、二量体、三量体

及び四量体の作製を目的に着目のタンパク質に遊離システインを導入する。着目のタンパク質を遊離システインへと結合させるには可変数(2~4)のマレイミド基をもつペプチド系架橋試薬が使用された。Cochran JR et al., Immunity, 2000 Mar, 12(3):241-50.

【0298】

[329.] 本発明のシステムでは、抗体Fv領域の一価型への折りたたみが可能なscFvを提示するようにファージライブラリー(前述)を設計した。さらに、またやはり前述のように、該構成体は細菌での発現に好適である。この遺伝子組換えによるscFvは、連続15アミノ酸のフレキシブルペプチドスペーサーによって連結された重鎖と軽鎖の可変領域を含む。好ましいスペーサーは(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>である。このスペーサーの長さはアミノ酸構成とも相俟って非かさ高スペーサーをもたらすことになるが、それはV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>領域がターゲットへの効果的な結合を実現する機能的Fvドメインへと折りたたまることを可能にする。

【0299】

[330.] 本発明は任意の公知技術の方法によって形成されるY1及びY17多量体に関連する。好ましい多量体(特に二量体)形成方法ではシステイン残基を使用して2単量体間にジスルフィド結合を形成させる。この実施態様では、二量体を形成しやすくするためにscFvのカルボキシル基末端にシステインを付加して二量体を形成する(Y1-cys scFv又はY1二量体という)。DNAコンストラクトの作製(Example 2D及び6Dを参照)とトランスフェクションへの使用により、Y1二量体を生産ベクター中で発現させ、in vitroでタンパク質を再生するようにした。このタンパク質をSDS-PAGE、HPLC及びFACSで解析した。しかし、二量体が形成されたことを示す結果はいずれでも得られなかった。そこで、同じ手順を繰返したが、今度は2リットルの回分発酵による抗体産生を試みた。Y1-cysをE. coli中で発現させた後、アルギニン中で再生した。再生したタンパク質をQ-Sepharoseとゲルろ過(Sephadex 75)で透析、精製した。SDS-PAGE(非還元)とゲルろ過により2つのピークが検出された。2つのピークを別々に回収し、FACSで解析した。単量体と二量体のJurkat細胞への結合をFACSで調べた。二量体による結合は同レベルの染色に1/100の量の単量体型抗体を必要としただけであり、これは二量体のほうが高アビディティーであることを示唆した。二量体の再生条件を決定し、また後続の透析、クロマトグラフィー及びゲルろ過ステップを経て二量体含有量(mg単位の量)が90%超の物質を得た。この精製二量体をゲルろ過と酸化条件下でのSDS-PAGEにより解析した。二量体の結合能を放射受容体測定、ELISA及びFACS解析で確認した。

【0300】

[331.] scFv単量体(別名CONY1)とY1二量体の結合を比較するために、KG-1細胞上でin vitro結合競合実験を行った。また、この実験では全Y1 IgGとscFv Y1の結合も比較した。この研究ではY1 IgGをビオチンで標識した。この研究によりY1 IgGはY1 IgG-ビオチンと競合することが判明した。非関連ヒトIgGは標識Y1 IgGと競合しなかった。Y1 scFv(5µg及び10µg)はY1 IgG-ビオチン(50ng)と部分的に競合した。この研究では、無血清では1ngのY1 IgG-FITCがKG-1細胞に1µgのY1 scFv-FITCと同程度に結合するが、血清の存在下ではこの結合がほぼ阻止されることも判明した。また、放射受容体測定、ELISA及びFACS解析からY1二量体の結合はY1 scFv単量体の結合より20倍以上も強いと判明した。

【0301】

[332.] さらに別の実施態様では、カルボキシル基末端にシステインとは別にリシン-アラニン-リシンを付加した(これはY1-cys-kak scFvと呼ぶ)。このscFv構成体のアミノ酸配列は次のとおりである(SEQ ID NO:212)。

【0302】

```

1 MEVQLVESGG GVVRPGGSLR LSCAASGFTF DDYGMWVRQ
APGKGLEWVS GINWNGGSTG 60
61 YADSVKGRFT ISRDNKNSL YLQMNSLRAE DTAVYYCARM
RAPVIWGQGT LVTVSRGGGG 120
121 SGGGGSGGGG SSELTQDPV SVALGQTVRI TCQGDSLRSY
YASWYQQKPG QAPVLTGYGK 180

```

181 NNRPSGIPDR FSGSSSGNTA SLTITGAQAE DEADYYCNSR  
DSSGNHVVFG GGTKLTVLGG 240  
241 GGCKAK

## 【0303】

[333.] Y1-cys-KAKは細菌中 -pLベクターで産生させた。 -pLベクターでの発現は温度を42 に高めて誘発した。発現誘発培養液から封入体を回収し、水溶液により半精製して不要の可溶性タンパク質を除去した。封入体をグアニジンで可溶化し、DTTで還元し、アルギニン/酸化-グルタチオン系の溶液でin vitro再生した。再生したタンパク質はTFF(クロスフロー過)法で尿素/磷酸緩衝液を含む緩衝液に透析、濃縮した。このタンパク質をSPカラムでイオン交換クロマトグラフィーにより再精製、濃縮した。

## 【0304】

[334.] 血小板由来の抗原GPIb(グリコカリシン)への二量体(Y1 scFv、別名Y1-kak)と二量体Y1-cys-kak (システイン二量体)の結合の違いをELISA法で確認した。GPIbへの結合の検出にはポリクローナル抗単鎖抗体及び/又は新規ポリクローナル抗V<sub>L</sub>(ウサギ由来)及び抗ウサギHRPを使用した。二量体は単量体よりも結合活性が約100倍高かった。たとえば0.8 ODの実現に使用された単量体は12.8 µg/mlであるのに対し、二量体は0.1 µg/mlにすぎない。図19を参照。

## 【0305】

[335.] さらにKG-1細胞への結合に関するFACS解析から、2段階又は3段階の結合検定では二量体のほうが単量体より高感度であると判明した。FITCで直接標識した二量体は単量体よりもやや有利であった(使用量が10分の1)。二量体を競合物質として使用したKG-1細胞への放射受容体測定では、二量体のほうが単量体よりも30倍も効率的であると判明した。

## 【0306】

[336.] スペーサーの長さを加減するのも二量体、三量体及び四量体(当業界ではそれぞれダイアポディー、トライポディー、テトラポディーともいう)を形成する好ましい方法である。二量体は、同じscFvの2本の可変鎖を連結するスペーサーを一般に5~12アミノ酸残基に短縮するような条件下で形成する。この短縮スペーサーは同じ分子に由来する2本の可変鎖が1つの機能的Fvドメインへと折りたたまれるのを防ぐ。代わりに両ドメインはそれぞれもう1つの分子の相補ドメインとペアを組んで2つの結合ドメインを形成する。好ましい方法では、わずか5アミノ酸残基のスペーサー(Gly<sub>4</sub>Ser)をダイアポディーの構築に使用した。この二量体は2個の同種scFvから、又は2個の異種scFvから、形成することができ、また親scFvの増進型の選択的及び/又は特異的結合活性を維持したり、さらに高い結合力又はアフィニティーを示したりすることができる。

## 【0307】

[337.] 同様にトライポディーは、同じscFvの2本の可変鎖を連結するスペーサーを一般に5未満のアミノ酸残基に短縮するような条件下で形成される。これにより同じ分子に由来する2本の可変鎖が1つの機能的Fvドメインへと折りたたまれるのを防ぐ。代わりに3個のscFv分子が会合して三量体を形成する。好ましい方法では、このフレキシブルスペーサーを完全になくすことによりトライポディーが得られた。トライポディーは3個の同種scFvから、又は2~3種のscFvから形成することができ、また親scFvの増進型の選択的及び/又は特異的結合活性を維持したり、さらに高い結合力又はアフィニティーを示したりすることができる。

## 【0308】

[338.] テトラポディーもまた、同じscFvの2本の可変鎖を連結するスペーサーを一般に5未満のアミノ酸残基に短縮するような条件下で形成される。これにより同じ分子に由来する2本の可変鎖が1つの機能的Fvドメインへと折りたたまれるのを防ぐ。代わりに4個のscFv分子が会合して四量体を形成する。テトラポディーは4個の同種scFvから、又は1~4個の異種scFvから形成することができ、また親scFvの増進型の選択的及び/又は特異的結合活性を維持したり、さらに高い結合力又はアフィニティーを示したりすることができる。

## 【0309】

[339.] スペーサーの長さを一般に5未満のアミノ酸残基とする条件下でトラアボディー又はテトラボディーが形成されるかどうかは混合液中の特定scFvのアミノ酸配列と反応条件とに依存する。

【0310】

[340.] 好ましい方法では、ビオチン/ストレプトアビジン会合を利用して四量体を形成する。酵素的にビオチン標識することができる新規の発酵構成体(ここではY1-Biotag又はY1-Bと呼ぶ)を創製した。BirA酵素の基質に当る配列をY1のC末端に付加した。BirA酵素は該配列内のリシン残基にビオチンを付加する。このY1-BiotagをE. coli中で発現させた。封入体のタンパク質を単離し、再生した。折りたたまれた状態のこのタンパク質は純度が95%超であり、1リットルの培養液(小規模、非至適条件)から100 mg余りが得られた。その分子質量はscFvとほぼ同じであることがHPLC、SDS-PAGE及びMSから判明した。Y1-Biotagは最も安定したFACS解析用試薬であると判明した。しかし、KG-1細胞へのY1-Biotagの結合を血清の存在下で調べるときの所要量は血清不存在下での同等の結合に比して多くなる(約10倍)。それにもかかわらず、この構成体は特異的ビオチニル化の利点、すなわち分子の結合部位が原型のまま残されるという利点をもたらす。また、各分子はビオチン1個だけで標識され、各分子がC末端で1個のビオチンを受け取るにすぎない。

【0311】

[341.] 所望位置に分子あたり1個のビオチンという限定標識法はストレプトアビジンとの併用による四量体の生産を可能にした。この四量体はY1-Bをストレプトアビジン-PEとインキュベートして形成した。

【0312】

[342.] FACS解析によれば、Y1-Bとストレプトアビジン-PEによって作製される四量体はY1 scFv単量体と比べて100~1000倍も高感度であった。Y1-B/ストレプトアビジン-PE四量体はY1-反応性細胞株の1つ(KG-1)に特異的に結合する模様である。この反応のバックグラウンド結合との差異はきわめて大きいため、少量の受容体を高感度で検出することができた。Y1BSAV四量体を使用した正常全血のFACS評価によれば、高反応性の化学種は存在しなかった。単球と顆粒球はわずかに陽性であったが、結果が陽性と出た細胞株たとえばKG-1細胞では該四量体の反応性はその100倍以上であった。

【0313】

[343.] 次に、四量体を細胞試料とインキュベートした。Y1四量体は低用量(5ng)で細胞株(KG-1)によく結合し、その応答は以前に他の抗体型で観測された応答より10~20倍も高かった。

【0314】

#### 診断治療用のコンジュゲート

[344.] 本発明の抗体及びその断片は多様な薬剤たとえば薬物、毒素及び放射性同位体へと、随意に製薬用担体と共に、会合、結合、融合又は連結させて疾病予防及び/又は抗がん活性を有する薬剤-ペプチド組成物、融合体又はコンジュゲートを形成することができる。そうしたコンジュゲート及び融合体はまた診断目的に使用してもよい。

【0315】

[345.] 本発明に有用な担体の例はデキストラン、HPMA(親油性ポリマー)又は他の任意のポリマーなどである。あるいは修飾リポソームたとえばscFv Y1分子で修飾したリポソーム(例:多量のドキシソルピシンを含有する市販リポソームDoxil)などを使用することもできる。その種のリポソームは1つ又は複数の薬剤を含有するように調製し、高薬剤/抗体比となるように本発明の抗体と混和することができる。

【0316】

[346.] あるいは、抗体又はその断片と薬剤との結合は直接結合でもよい。2以上の隣接分子の直接結合は分子中の要素又は要素群の間の化学結合を介して実現してもよい。化学結合はたとえばイオン結合、共有結合、疎水結合、親水結合、静電結合又は水素結合でもよい。それらの結合はたとえばアミン結合、カルボキシル結合、アミド結合、ヒドロキシル結合、ペプチド結合及び/又はジスルフィド結合でもよい。直接結合はプロテアーゼ抵

抗性結合であるのが好ましい。

【0317】

[347.] ペプチドと薬剤との、又はペプチドと担体との、又は担体と薬剤との結合はリンカー化合物を介した結合でもよい。リンカー化合物は、本明細書及び特許請求の範囲では、2以上の部分を結合する化合物をいう。リンカーは直鎖型でも分枝型でよい。分岐型リンカー化合物は二分枝、三分枝、又は四分枝以上の化合物からなってもよい。本発明に有用なリンカー化合物は、たとえばジカルボン酸、マレイミドヒドラジド、PDPH、カルボン酸ヒドラジド及び小ペプチドを含む群より選択される。

【0318】

[348.] 本発明の有用リンカーのもっと具体的な例は次のとおりである：

- a. ジカルボン酸たとえばコハク酸、グルタル酸及びアジピン酸など；
- b. マレイミドヒドラジドたとえばN-[ -マレイミドカプロン酸]ヒドラジド、4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシルヒドラジド、及びN-[ -マレイミドウンデカン酸]ヒドラジドなど；
- c. PDPHリンカーたとえばスルフヒドリル反応性タンパク質と結合した(3-[2-ピリジルジチオ]プロピオニルヒドラジド)；及び
- d. 炭素原子数2~5のカルボン酸ヒドラジド。

【0319】

[349.] 小ペプチドを使用したダイレクトカップリングによる結合もまた有用である。たとえば、抗がん薬ドキソルビシンなどの遊離糖とscFvとのダイレクトカップリングは小ペプチドを使用して実現してもよい。小ペプチドの例はAU1、AU5、BTag、c-myc、FLAG、Glu-Glu、HA、His6、HSV、HTTPhH、IRS、KT3、Protein C、S-Tag(登録商標)、T7、V5及びVSV-Gなどである。

【0320】

[350.] 本発明の抗体及びその断片は造影剤(指示マーカともいう)たとえば放射性同位体と結合、抱合、複合し、又は他の形で結び付けてコンジュゲートとし、それを診断及び画像解析目的に使用してもよい。そうした放射性同位体-抗体(又は抗体断片)コンジュゲートを含むキットが提供される。

【0321】

[351.] 診断に有用な放射性同位体の例は<sup>111</sup>インジウム、<sup>113</sup>インジウム、<sup>99m</sup>レニウム、<sup>105</sup>レニウム、<sup>101</sup>レニウム、<sup>99m</sup>テクネチウム、<sup>121m</sup>テルル、<sup>122m</sup>テルル、<sup>125m</sup>テルル、<sup>165</sup>ツリウム、<sup>167</sup>ツリウム、<sup>168</sup>ツリウム、<sup>123</sup>ヨウ素、<sup>126</sup>ヨウ素、<sup>131</sup>ヨウ素、<sup>133</sup>ヨウ素、<sup>81m</sup>クリプトン、<sup>33</sup>キセノン、<sup>90</sup>イットリウム、<sup>213</sup>ビスマス、<sup>77</sup>臭素、<sup>18</sup>フッ素、<sup>95</sup>ルテニウム、<sup>97</sup>ルテニウム、<sup>103</sup>ルテニウム、<sup>105</sup>ルテニウム、<sup>107</sup>水銀、<sup>203</sup>水銀、<sup>67</sup>ガリウム及び<sup>68</sup>ガリウムなどである。好ましいのは、X線又は常磁性イオンを通さない放射性同位体である。

【0322】

[352.] 指示マーカ分子は蛍光マーカ分子でもよい。蛍光マーカ分子の例はフルオレセイン、フィコエリトリン又はローダミンもしくはそれらの修飾体又はコンジュゲートなどである。

【0323】

[353.] 指示マーカに結合した抗体又は断片は病態の診断又はモニタリングに使用してもよい。そうしたモニタリングはin vivo、in vitro又はex vivoいずれで行ってもよい。モニタリング又は診断をin vivo又はex vivoで行う場合には、造影剤は患者に許容限度を超える害を及ぼさないという意味で生理的に許容しうるものが好ましい。許容レベルの害は、臨床医が病気の重篤度や代替品の利用可能性といった基準を用いて決定することになる。

【0324】

[354.] 本発明は治療前・中・後のin vitro治療有効性解析用の診断キットであって、指示マーカ(又は造影剤)に結合した本発明のペプチドを含む造影剤などからなる診断キッ

トを提供する。本発明はさらに、がん特に腫瘍の診断的的定位及び画像解析に造影剤を使用する方法であって、

- a) 細胞を造影剤と接触させるステップ
- b) 細胞に結合した放射能を計測するステップ、及び
- c) 腫瘍を視覚化するステップ

を含む方法を提供する。

【0325】

[355.] 好適な造影剤の例はFITC、PEなどの蛍光色素、及びグリーン蛍光タンパク質などの蛍光タンパク質である。他の例は、基質と反応して識別可能な変化たとえば色の変化を引き起こす放射性分子及び酵素などである。

【0326】

[356.] 一例では、キットの造影剤はFITCなどの蛍光色素であり、キットはがん特に血液関連のがんたとえば白血病、リンパ腫及び骨髄腫の治療有効性の解析に供する。疾患の各段階たとえば診断時、治療時、寛解期及び再発期に造影剤で染色された細胞の百分率及び染色強度の決定にはFACS解析を用いる。

【0327】

[357.] 本発明の抗体及びその断片は抗がん薬、抗白血病薬、抗ウイルス薬、抗転移薬、抗炎症薬、抗血栓薬、抗再狭窄薬、抗凝集薬、抗自己免疫薬、抗接着薬、抗心臓血管病薬、又は他の抗疾病薬又は薬剤と結合し、複合し又は他の形で結び付けてもよい。薬剤は、ヒト、ウシ、ウマ、ブタ、マウス、イヌ、ネコ又は他の任意の温血動物を非限定的に含む哺乳動物の疾患予防、治療又は診断に有用な物質をいう。

【0328】

[358.] そうした薬剤の非限定的な例は抗ウイルス薬たとえばアシクロビル、ガンシクロビル及びジドブジン；抗血栓/再狭窄薬たとえばシロスタゾール、ダルテパリンナトリウム、レビパリンナトリウム及びアスピリン；抗炎症薬たとえばザルトプロフェン、プラノプロフェン、ドロキシカム、acetyl salicylic 17、ジクロフェナク、イブプロフェン、デキシブプロフェン、スリンダク、ナプロキセン、アムトルメチン、セレコキシブ、インドメタシン、ロフェコキシブ及びニメスリド；抗自己免疫薬たとえばレフルノマイド、デニロイキンジフチトクス(denileukin diftitox)、スブロイム(subreum)、WinRho SDF、デフィプロチド及びシクロホスファミド；及び抗接着/抗凝集薬たとえばリマプロスト、クロルクロメン及びヒアルロン酸などである。

【0329】

[359.] 他の薬剤例はドキシソルピシン(アドリアマイシン)、モルホリノドキシソルピシン、メトキシモルホリニルドキシソルピシン、シスプラチン、タキソール、カリケアマイシン、ピンクリスチン、シタラビン(Ara-C)、シクロホスファミド、プレドニゾン、ダウノルピシン、モルホリノダウノルピシン、メトキシモルホリニルダウノルピシン、イダルピシン、フルダラビン、クロラムブシル、インターフェロン、ヒドロキシウレア、テモゾロマイド、サリドマイド及びブレオマイシン、並びにその誘導体及び組合せなどである。

【0330】

[360.] 抗がん薬は抗がん活性を有する物質である。抗がん薬の例は、がん細胞又は未成熟前がん細胞の成長を阻害し又は停止させる物質、がん細胞又は前がん細胞を傷害する物質、がん細胞又は前がん細胞の他抗がん薬への感受性を増進する物質、及びがん細胞の転移を阻害する物質などである。本発明では、抗がん薬は腫瘍の血管新生を防止、阻害又は抑制する抗血管新生活性を有する物質でもよい。

【0331】

[361.] がん細胞の成長の阻害はたとえば(i)がん又は転移細胞の成長防止、(ii)がん又は転移細胞の成長抑制、(iii)がん細胞を無傷のまま生存させた状態での、その成長過程又は転移過程の完全防止、又は(iv)がん細胞の傷害を含む。

【0332】

[362.] 抗白血病薬は抗白血病活性を有する物質である。抗白血病薬の例は、白血病細胞

又は未成熟前白血病細胞の成長を阻害し又は停止させる物質、白血病細胞又は前白血病細胞を傷害する物質、白血病細胞又は前白血病細胞の他抗白血病薬への感受性を増進する物質、及び白血病細胞の転移を阻害する物質などである。本発明では、抗白血病薬は腫瘍の血管新生を防止、阻害又は抑制する抗血管新生活性を有する物質でもよい。

【0333】

[363.] 白血病細胞の成長の阻害はたとえば(i)白血病又は転移細胞の成長防止、(ii)白血病又は転移細胞の成長抑制、(iii)白血病細胞を無傷のまま生存させた状態での、その成長過程又は転移過程の完全防止、又は(iv)白血病細胞の傷害を含む。

【0334】

[364.] 本発明の抗体又は断片を有用に結合してもよい抗疾病薬、抗がん薬、及び抗白血病薬の例には毒素、放射性同位体及び治療薬が含まれる。

【0335】

[365.] 毒素の例はgelonin、Pseudomonas外毒素(PE)、PE40、PE38、ジフテリア毒、リシン(ricin)、もしくはそれらの修飾体又は誘導体などである。

【0336】

[366.] 放射性同位体の例は、診断及び/又は治療用の 放出体、陽電子放出核及びX線放出体、それに治療用の 放出体及び 放出体などである。

【0337】

[367.] 治療用の放射性同位体の具体例は<sup>111</sup>インジウム、<sup>113</sup>インジウム、<sup>99m</sup>レニウム、<sup>105</sup>レニウム、<sup>101</sup>レニウム、<sup>99m</sup>テクネチウム、<sup>121m</sup>テルル、<sup>122m</sup>テルル、<sup>125m</sup>テルル、<sup>165</sup>ツリウム、<sup>167</sup>ツリウム、<sup>168</sup>ツリウム、<sup>123</sup>ヨウ素、<sup>126</sup>ヨウ素、<sup>131</sup>ヨウ素、<sup>133</sup>ヨウ素、<sup>81m</sup>クリプトン、<sup>33</sup>キセノン、<sup>90</sup>イットリウム、<sup>213</sup>ビスマス、<sup>77</sup>臭素、<sup>18</sup>フッ素、<sup>95</sup>ルテニウム、<sup>97</sup>ルテニウム、<sup>103</sup>ルテニウム、<sup>105</sup>ルテニウム、<sup>107</sup>水銀、<sup>203</sup>水銀、<sup>67</sup>ガリウム及び<sup>68</sup>ガリウムなどである。

【0338】

[368.] 抗がん薬又は抗白血病薬の非限定的な例はドキシソルピシン(アドリアマイシン)、モルホリノドキシソルピシン、メトキシモルホリニルドキシソルピシン、シスプラチン、タキソール、カリケアマイシン、ピンクリスチン、シタラピン(Ara-C)、シクロホスファミド、プレドニゾン、ダウノルピシン、モルホリノダウノルピシン、メトキシモルホリニルダウノルピシン、イダルピシン、フルダラピン、クロラムブシル、インターフェロン、ヒドロキシウレア、テモゾロマイド、サリドマイド及びブレオマイシン、並びにその誘導体及び組合せなどである。

【0339】

#### 製剤組成物

[369.] 本発明の抗体、構成体、コンジュゲート、及び断片はそれを必要とする患者に任意好適の方法で投与してよい。投与方法の例は静脈内、筋内、皮下、局所、髄腔内、腹腔内、リンパ管内、経鼻、舌下、経口、直腸、膣、呼吸器、口腔、皮内、経皮又は胸腔内投与などである。

【0340】

[370.] 静脈内投与用の組成物は、約0.1mg~約1000mgの有効量の所望組成物が患者に投与されるよう調製するのが好ましい。より好ましくは、投与量が約1mg~約500mgの範囲の所望組成物となるようにする。本発明の組成物は広い投与量範囲にわたり有効であるが、該範囲は種々の因子たとえば治療対象疾患の詳細、ペプチド又はポリペプチド系製剤組成物の患者体内での半減期、薬剤や製剤組成物の物理化学的性質、製剤組成物の投与方法、治療又は診断対照患者の詳細、及び/又は主治医が重要と判断する他のパラメーターなどに依存する。

【0341】

[371.] 経口投与用の組成物は任意好適の剤型でよい。例は錠剤、液剤、乳剤、懸濁剤、シロップ剤、丸剤、カプレット剤及びカプセル剤などである。製剤方法は技術上周知であり、たとえばRemington, The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro

(Ed.), Lippincott, Williams & Wilkins (Pub.)を参照。

【0342】

[372.] 製剤組成物は時限、持続、間欠又は連続放出を容易にするように調製してもよい。製剤組成物はまた時限、持続、間欠又は連続放出手段に収めて投与してもよい。

【0343】

[373.] 局所投与用の製剤組成物は任意好適の剤型たとえばクリーム、軟膏、ローション、パッチ、溶液、懸濁液及びジェルなどとすることができる。

【0344】

[374.] 本発明の抗体、構成体、コンジュゲート及び断片を含む組成物は慣用の、製薬上許容しうる希釈剤、賦形剤、担体等を含んでもよい。錠剤、丸剤、カプレット剤及びカプセル剤は慣用の賦形剤たとえばラクトース、デンプン及びステアリン酸マグネシウムなどを含んでもよい。座剤はワックスやグリセリンなどの賦形剤を含んでもよい。注射剤は発熱物質を含まない滅菌溶媒たとえば生理食塩水などを含んでもよいし、緩衝剤、安定化剤又は防腐剤を含んでもよい。慣用の腸溶コーティングも使用してよい。

【0345】

[375.] 以下の実施例は本発明の理解に資するのが目的であり、その範囲を何ら限定するものではない。具体的な試薬や反応条件を挙げてはいるが、種々の変更が可能であり、それらもまた本発明の範囲に包摂されるものとする。従って、以下の実施例は本発明のさらなる説明が目的である。

【0346】

実施例1: 血小板の調製

1.1 洗浄血小板の調製

[376.] ACD(酸性クエン酸-デキストロース)加濃縮血小板を血液センターから入手し、血小板を分離して、ACDと生理食塩水を7:1の比で含む緩衝液で1回洗浄した。血小板は各洗浄後に800×gで10分、遠心分離し、タイロッド液(2mM MgCl<sub>2</sub>、137mM NaCl、2.68 mM KCl、3mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.1%グルコース、5mM Hepes及び0.35%アルブミン、pH 7.35)に再懸濁し、細胞数をカウントした。

【0347】

1.2 多血小板血漿の調製

[377.] 3.8%クエン酸ナトリウム入りチューブに採血し、250×g、10分の遠心で多血小板血漿を調製した。

【0348】

実施例2: 血小板凝集

[378.] 血小板凝集研究では、多血小板血漿 (PRP) と洗浄血小板を全血 Lumiaggregometer (Chronolog, Havertown, PA) により 37、500rpm でかき混ぜた。血小板懸濁液と懸濁媒の透光度の差を100%凝集とした。血小板凝集へのY1の効果、種々の濃度のY1をアゴニスト添加前に添加して評価し、またその効果を4分間記録した。

【0349】

実施例3: 血小板のエンドプロテアーゼ処理

3.1 モカラギンによる血小板の処理

[379.] モカラギン消化では、1mM塩化カルシウム添加TS緩衝液(0.01M Tris、0.15M塩化ナトリウム、pH 7.4)に懸濁させた洗浄血小板10<sup>8</sup>個を(終濃度)12µg/mlのモカラギンにより22で1時間処理し、EDTAを0.01Mまで加えて消化を止めた。

【0350】

3.2 カテプシンGによるグリコカリシンの処理

[380.] 1mM塩化カルシウム添加TS緩衝液に懸濁させた洗浄血小板10<sup>8</sup>個を(終濃度)1.8µg/mlのカテプシンGにより22で4時間処理し、PMSFを1mMまで加えて消化を止めた。

【0351】

0-シアロ糖タンパク質エンドプロテアーゼによるグリコカリシンの処理

[381.] 0.2%アルブミンとプロテアーゼインヒビター(10µMロイペプチン、0.24mM PMSF)

とを含む0.1M Tris緩衝液(pH7.4)に懸濁させた血小板 $10^6$ 個を0-シアロ糖タンパク質エンドプロテアーゼ0.14 mg/ml(終濃度)と37 で45分間インキュベートし、試料緩衝液の添加と沸騰により消化を停止させた。使用した試料緩衝液は3% SDS、12%グリセリン、50mM Tris-HCl、2%メルカプトエタノール及び0.03%プロモフェノールブルーを含む。

【0352】

実施例4: エンドプロテアーゼによるグリコカリシンの切断

モカラギンによるグリコカリシンの切断

[382.] モカラギン消化では、1mM塩化カルシウム添加TS緩衝液に溶かしたグリコカリシンを(終濃度)10 $\mu$ g/mlのモカラギンにより22 で1時間処理し、EDTAを0.01Mまで加えて消化を止めた。

【0353】

カテプシンGによる

[383.] 1mM塩化カルシウム添加TS緩衝液に溶かしたグリコカリシンを(終濃度)3.4 $\mu$ g/mlのカテプシンGにより22 で4時間処理した後、PMSFを1mMまで加えて消化を止めた。

【0354】

0-シアロ糖タンパク質エンドプロテアーゼによる

[384.] 0.05M Tris緩衝液(pH 7.4)に溶かしたグリコカリシンを0-シアロ糖タンパク質エンドプロテアーゼ1.2mg/ml(終濃度)と37 で15分間インキュベートし、(実施例3(YH)で述べた)試料緩衝液の添加と沸騰により消化を止めた。

【0355】

実施例5: フルサイズY1 IgGの構築

[385.] 全IgG分子はFv型に比して、長いin vivo半減期やin vitro細胞応答たとえばADCC又はCDC(補体依存型細胞傷害性; Tomlinson, Current Opinions of Immunology, 5, 83-89, 1993)を介した細胞応答の誘発能などいくつかの利点をもつ。後述の分子クローニング手法により、Y1 Fv領域をフルサイズIgG1分子に変換した。Y1-IgG1の構築は次の順序でcDNAの断片を互いにつなぎ合わせることで実現した。なおY1-IgG重鎖及び軽鎖の配列は図48のとおりである。図ではY1-HCのヌクレオチド配列のオープンリーディングフレーム(ORF)(SEQ ID NO: 205)、Y1-HCのアミノ酸配列(SEQ ID NO:206)、Y1-LCのヌクレオチド配列のORF(SEQ ID NO:207)及びY1-LCのアミノ酸配列(SEQ ID NO:208)を示す。

【0356】

[386.] 哺乳動物発現系のためのリーダー配列: 全IgG分子に要求される諸エレメントの便利な挿入を可能にするよう、互換性のある系を設計した。推定リーダー配列をコードする以下の相補二本鎖オリゴヌクレオチドを合成し、アニールし、pBJ-2哺乳動物発現ベクターの(SR 5プロモーター支配下の)XhoI部位にライゲートした:

【0357】

5' -TCGACC TCATCA CCATGG CCTGGG CTCTGC TGCTCC TCA CCC TCCTCA CTCAGG ACACAG GGTCC T GGGCCG AT及び

【0358】

5' -GATCGA TTGCAC CAGCTG GATATC GGCCCA GGACCC TGT GTC CTGAGT GAGGAG GGTGAG GAGCA G CAGAGC CCAGGC CATGGT GATGAG G。

【0359】

開始コドンATGの上流に2つのKozakエレメントを導入した。またリーダー配列の推定切断部位とXhoI部位の間に内部EcoRV部位を導入して、可変領域のサブクローニングができるようにした。この改変ベクターはpBJ-3と命名した。

【0360】

[387.] Y1 scFv cDNA配列に由来するV<sub>L</sub>コード配列をリーダー配列と軽鎖定常領域コード配列の間に挿入した。同様に、Y1 scFv cDNA配列に由来するV<sub>H</sub>コード配列をリーダー配列と重鎖定常領域コード配列の間に挿入した。これは原Y1をコードするベクターpHEN-Y1のPCR増幅によりV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>領域を個別に獲得して実現した。

【0361】

### オリゴヌクレオチド

[388.]  $V_L$  PCR反応には5' -TTTGAT ATCCAG CTGGTG GAGTCT GGGGGA (センス鎖)と5' -GCT GAC CTAGGA CGGTCA GCTTGGT (アンチセンス鎖)を使用した。期待サイズ ~ 350bpの産物cDNAを精製し、配列解析し、EcoRV及びAvrII制限酵素で消化した。同じ方法により、下記のセンス鎖及びアンチセンス鎖オリゴヌクレオチドを用いて $V_H$  cDNA領域を増幅し、精製した:

【0362】

[389.] 5' -GGGATA TCCAGC TG(C/G)(A/T)GG AGTCGG GC及び5' -GGACTC GAGACG GTGACC A GGGTA CCTTG。

【0363】

[390.] 定常領域: IgG1 cDNA用の定常 3 (CL- 3)領域と重鎖定常領域CH1-CH3を次の要領で個別に合成した:

【0364】

[391.] 定常CL- 3領域を得るために、正常末梢血B細胞(CD19+細胞)プールから抽出したmRNAとセンス鎖5' -CCGTCC TAGGTC AGCCCA AGGCTG C及びアンチセンス鎖5' -TTTGCG GCCG CT CATGAA CATTCT GTAGGG GCCACT GTオリゴヌクレオチドを用いてRT-PCRを行った。期待サイズ ~ 400bpのPCR産物を精製、配列解析し、AvrII及びNotI制限酵素で消化した。

【0365】

[392.] 定常IgG1領域(鎖)を得るために、BTGで不死化させたヒトB細胞クローン(CMV-クローン#40)をPCR増幅用を選択した。このクローンはヒトCMVに対してIgG1を分泌すること、またin vitroアッセイでADCC応答を誘発することが明らかにされた。CH1-CH3 cDNA用に、オリゴヌクレオチド5' -ACCGCT CGAGTG C(T/C)TCCA CCAAGG GCCCAT C(G/C)G TCT TC (センス鎖)及び

5' -TTTGCG GCCGCT CATTTA CCC(A/G)GA GACAGG GAGAGG CT (アンチセンス鎖)を合成し、PCR増幅に使用した。CL cDNAコード配列の場合と同様に、期待配列 ~ 1500bpのPCR産物を精製、配列解析し、AvrII及びNotI制限酵素で消化した。

【0366】

[393.] 最終発現ベクターを得るために、EcoRV-NotI消化済みpBJ-3ベクター、EcoRV-AvrII可変領域cDNA及びAvrII-NotI定常領域を用いて三重ライゲーションを実行した。重鎖及び軽鎖用の最終発現ベクターはそれぞれpBJ-Y1-HC及びpBJ-Y1-LCと命名した。

【0367】

[394.] ピューロマイシン耐性遺伝子(PAC)に基づく二重選択を可能にするため、pBJ-Y1-LCを基礎にして追加ベクターpBJ-Y1-LPを構築した。このベクターではpBJ-Y1-LCベクターのネオマイシン耐性遺伝子がPAC遺伝子に対応する ~ 1600bpの断片(pMCC-ZPベクターに由来)に置き換わっている。

【0368】

[395.] Y1-HC、Y1-LC双方のORFとそれぞれがコードしているアミノ酸配列はSEQ ID NO: 205 ~ 208のとおりである。

【0369】

[396.] 下線部がリーダー配列である。 $V_H$ 及び $V_L$ 領域は太字のアミノ酸配列に対応し、その後にはIgG1 (重鎖の場合)又は 3(軽鎖の場合)定常領域配列が続く。

【0370】

[397.] CHO細胞でのY1重鎖及び軽鎖の発現: ベクターpBJ-Y1-HC及びpBJ-Y1-LCを個別に、重鎖又は軽鎖を発現する安定細胞のトランスフェクションと選択に使用した。G418に基づく選択と細胞増殖の後、上清中の分泌タンパク質についてIgG1の発現を、以下述べるようにキャプチャーEIA法及びウェスタンブロット法で解析した。

【0371】

[398.] キャプチャーEIA法: 96穴プレートのウェルをマウス抗ヒトIgG1 Fc (Sigma)でコートした。前記の上清をウェルに加え、重鎖IgG1の存在をビオチニル化ヤギ抗鎖特異抗体(Sigma)、ストレプトアビジン-HRP及び基質を用いて検出した。ELISAプレートリーダー

で $A_{405}$ での発色をモニターした。

【0372】

[399.] ウェスタンブロット解析：前記細胞の上清を12.5% SDS-PAGE電気泳動にかけた。各鎖の発現を(a)重鎖検出用のヤギ抗ヒトIgG-HRP (H+L; Sigma Cat #A8667)及び(b)軽鎖検出用のビオチニル化ヤギ抗ヒト 3鎖(Southern Biotechnology Association, Cat #207 0-08)で検出した。

【0373】

[400.] 両鎖の発現を上記のアッセイで確認し、コトランスフェクションによりフルサイズY1-IgG1を得た。

【0374】

IgG-Y1の発現と精製

[401.] 細胞培養とトランスフェクション：CHO細胞を、37℃、5% CO<sub>2</sub>雰囲気中、10%ウシ胎仔血清と40 µg/mlゲンタマイシンとを添加したF-12培地で培養した。トランスフェクションの1日前に、 $0.8 \sim 1 \times 10^6$ 細胞を90mmディッシュに植え込んだ。培養細胞に10 µgの軽鎖及び重鎖DNAをFuGene (Roche)トランスフェクション試薬法でコトランスフェクションした。非選択培地で2日間増殖後、550 µg/mlネオマイシンと3 µg/mlピューロマイシンとを添加したF-12培地で細胞を10~12日間培養した。細胞をトリプシン処理し、Costar 96穴プレートを用いて細胞0.5個/ウェルの限界希釈法でクローニングした。個別コロニーを取り出し、6穴ディッシュで増殖させ、フラスコに移した。

【0375】

[402.] 重鎖及び軽鎖分泌の測定：トランスフェクションしたCHO細胞の上清中に分泌された抗体の濃度をサンドウィッチELISA法で測定した。抗体濃度の測定には以下の試薬を使用した：コート抗体としてのモノクローナル抗ヒトIgG1(Fc) (Sigma)、検出試薬としてのヤギ抗ヒトIgG (鎖特異的)ビオチンコンジュゲート(Sigma)、及びスタンダードとしての純粋ヒトIgG1 (Sigma)。このELISA法によれば産生速度は3~4 µg/mlの範囲であった。

【0376】

[403.] MAbの細胞からの産生と精製：細胞をローラーボトルにより、10%ウシ胎仔血清とネオマイシン及びピューロマイシンを添加したF-12培地中で終濃度 $1 \sim 2 \times 10^8$ 細胞/ボトルとなるまで増殖させた。産生用として、細胞を同じ培地(ただし2%ウシ胎仔血清を添加)でさらに2日間培養した。

【0377】

[404.] 分泌抗体をProtein G-Sepharoseカラム(Pharmacia)で精製した。結合には20mMリン酸ナトリウム緩衝液pH 7.0を、溶離には0.1Mグリシン緩衝液pH 2.5-3.0をそれぞれ用いた。精製抗体の量はUV吸光度法で求め、純度はSDS-PAGE電気泳動で分析した。非変性条件下では全IgG抗体は期待分子質量が160kDである。変性ゲル中では重鎖、軽鎖の期待サイズはそれぞれ55kD、28kDである。

【0378】

[405.] フルサイズIgG-Y1分子の結合：IgG-Y1分子とscFv-Y1分子の結合レベルを比較測定するために結合実験を行った。二段階染色法を採用して、5ngのIGG-Y1をRAJI細胞(陰性対照、図44-47a)及びJurkat細胞(Y1陽性細胞、図44-47b及び44-47c)の両方と反応させた。検出にはPE標識ヤギ抗ヒトIgGを使用した(図44-47c)。同様に、1 µgのscFv-Y1をJurkat細胞と反応させ(図44-47b)、またPE標識ウサギ抗scFvを検出に使用した。IgG-Y1もscFv-Y1もJurkat細胞に結合するが、scFv-Y1ではIGG-Y1と同程度の検出レベルを実現するには約 $10^3$ 倍の量が必要になるとの結果が出た。

【0379】

実施例6：全IgG-Y1抗体由来のFab及びF(ab')<sub>2</sub>フラグメントの調製

細胞培養と一過性トランスフェクション

[406.] CHO細胞を、37℃、5% CO<sub>2</sub>雰囲気中、10%ウシ胎仔血清と40 µg/mlゲンタマイシンとを添加したF-12培地で培養した。トランスフェクションの1日前に、 $1 \sim 1.5 \times 10^6$ 細胞を

90mmディッシュに植え込んだ。培養細胞に、それぞれ別個の真核発現系に収めたY1抗体の軽鎖及び重鎖可変領域をコードする10 $\mu$ gのDNAをコトランスフェクションした。トランスフェクションにはFuGene (Roche)トランスフェクション試薬法を用いた。

【0380】

[407.] 非選択増殖培地で2日間増殖後、550 $\mu$ g/mlネオマイシンと3 $\mu$ g/mlピューロマイシンとを添加したF-12培地で細胞を10~12日間培養した。細胞をトリプシン処理し、Costar 96穴プレートを用いて細胞0.5個/ウェルの限界希釈法でクローニングした。個別コロニーを取り出し、6穴ディッシュで増殖させ、フラスコに移し(発現レベルと増殖培地中抗体分泌レベルを測定するための)さらなる選択に回した。

【0381】

#### 細胞培養と長期トランスフェクション

[408.] CHO細胞を、37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>雰囲気中、10%ウシ胎仔血清と40 $\mu$ g/mlゲンタマイシンとを添加したF-12培地で培養した。トランスフェクションの1日前に、0.8~1 $\times$ 10<sup>6</sup>細胞を90mmディッシュに植え込んだ。培養細胞に、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーターの支配下にクローニングしたY1抗体の軽鎖及び重鎖をコードする10 $\mu$ gのDNAとsv-40プロモーターの支配下にクローニングしたdhfr遺伝子とをコトランスフェクションした。トランスフェクションはFuGene (Roche)トランスフェクション試薬法で行った。非選択培地で2日間増殖した後、100nM~5 $\mu$ Mメトトレキサート(MTX)と透析処理したウシ胎仔血清とを含む培地で細胞を培養し、(限界希釈法後に)全Y1抗体を一段と高レベルに発現するクローンを選択した。

【0382】

#### 重鎖及び軽鎖分泌の測定

[409.] トランスフェクションしたCHO細胞の上清中に分泌される抗体の濃度を測定するためにサンドウィッチELISA法を確立した。抗体濃度の測定には以下の試薬を使用した: コート抗体としてのモノクローナル抗ヒトIgG1(Fc) (Sigma)、検出試薬としてのヤギ抗ヒトIgG (鎖特異的)ピオチンコンジュゲート(Sigma)、及びスタンダードとしての純粋ヒトIgG1 (Sigma)。

【0383】

#### MAbの細胞からの産生と精製

[410.] 細胞をローラーボトルにより、(前述のように)10%ウシ胎仔血清とネオマイシン及びピューロマイシンを添加したF-12培地中で終濃度1~2 $\times$ 10<sup>8</sup>細胞/ボトルとなるまで増殖させた。抗体産生用として、細胞を同じ培地(ただし2%ウシ胎仔血清)でさらに2日間培養した。

【0384】

[411.] 分泌抗体をProtein G-Sepharoseカラム(Pharmacia)とイオン交換カラム-Q Sepharose(Pharmacia)で精製した。結合には20mMリン酸ナトリウム緩衝液pH 7.0を、溶離には0.1Mグリシン緩衝液pH 2.5-3.0をそれぞれ用いた。精製抗体の量はUV吸光度及びELISA法で求め、純度はSDS-PAGEとHPLCで分析した。非変性条件下では全IgG抗体は期待分子質量が160kDである。変性ゲル中では重鎖、軽鎖の期待サイズはそれぞれ55kD、28kDである。

【0385】

#### Y1 IgGのFab及びF(ab')<sub>2</sub>フラグメントへの断片化

[412.] IgG分子は2個の同じ軽鎖と2個の同じ重鎖からなる。これらの軽鎖及び重鎖は非共有相互作用と共有結合(ジスルフィド結合)の組合せによりまとめられて折りたたみ構造(ドメイン)をなす。軽鎖は1つの可変ドメインと1つの定常ドメインからなる。重鎖は1つの可変ドメイン(V<sub>H</sub>)と3つの離れた定常ドメイン(CH1、2及び3)からなる。重鎖定常ドメイン1(CH1)と重鎖定常ドメイン2(CH2)の間の「ヒンジ」領域は酵素によるタンパク質分解作用を受けやすい。このヒンジ領域の切断によりFab又はF(ab')<sub>2</sub>フラグメントとFcフラグメントが生じる。Fabフラグメントは原型IgG分子の抗原結合能を保持するが、非特異的結合能は低い。Fabフラグメントは、エフェクター機能を欠く抗原結合能が求められるような状況に最適である。

## 【0386】

[413.] Fab及びF(ab')<sub>2</sub>フラグメントは診断又は治療薬としてin vivoで使用される。がん化学療法薬を、すべての細胞を傷害する薬剤ではなく腫瘍特異的薬剤にするには、薬剤を腫瘍の細胞表面抗原に結合する抗体に連結すればよい。原型IgGの使用ではなくFab又はF(ab')<sub>2</sub>フラグメントの使用には次のような利点がある。

## 【0387】

[414.] (1)フラグメントは容易に毛管を通過し組織表面に拡散しうる。

## 【0388】

[415.] (2)コンジュゲートを結合していないフラグメントは同様の原型IgGよりもすみやかに排泄されよう。従って、ターゲット領域に到達するフラグメント-治療薬の量が多くなる。

## 【0389】

Fabフラグメント調製の詳細手順

[416.] シス테인HCl濃度2mg/ml [F(ab')<sub>2</sub>フラグメント調製用]及び20mg/ml (Fabフラグメント調製用)の消化用緩衝液を入れた2ml固定化フィシン・カラムに精製Y1抗体1mgを添加し、37℃で5時間(Fabの場合)及び20時間[F(ab')<sub>2</sub>の場合]反応させた。ImmunoPure結合用緩衝液4mlで消化物を溶離することにより反応を停止させた。Protein Aカラムと結合用緩衝液を使用して未消化IgG及びFcフラグメントからFab又はF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを通過液として分離した。280nmでの吸光度を読み取ることで、フラグメントを含むピーク画分を集めた。10kDa又は30kDaをカットオフ分子質量とするマイクロコンセントレーターでフラグメントを濃縮しPBSに対して透析した。タンパク質の回収、純度測定及び解析は280nmでの吸光度、ゲル電気泳動及びHPLCで行った。

## 【0390】

細胞抽出物(溶解物)の調製

[417.]  $2 \times 10^6$ 個の細胞を回収しマイクロ遠心機にかけた(1300rpm、4分、5分間)。洗浄のため、ペレットに0.5~1 ml PBS+piを加え静かに混合した。混合液を前述の要領で遠心した。0.5~1 ml PBS+piによる洗浄を繰り返し、混合液を前述の要領で遠心した。ペレット化した細胞を溶解用緩衝液に再懸濁した(200µl/20×10<sup>6</sup>個細胞ペレット)。使用緩衝液は50mM Tris pH 7.4、1mM PMSF、1%NP-40及び1mM EDTAであるが、他の好適な緩衝液でもよい。懸濁液を氷上で約30分間インキュベートし、次いで遠心にかけた(3000rpm、4分、5分間)。上清を回収して一定量に分割した。

## 【0391】

粗製膜画分の調製と膜タンパク質の抽出

[418.] 凝縮細胞に対し20倍量のホモジナイズ緩衝液を加えた。使用ホモジナイズ緩衝液は2%(w/v) Tween 20、1mM MgSO<sub>4</sub>、2mM CaCl<sub>2</sub>、150mM NaCl及び25mM Tris-HCl、pH 7.4であった。以下のプロテアーゼインヒビターを添加した：1mM PMSF、5µg/mlロイペプチン及び5µg/mlアプロトニン。回転式Teflonペスル(Ultra Torex)付Potter-Elvehjemホモジナイザーで3~5ストロークして細胞をホモジナイズした。試料はホモジナイズ処理時に保冷し続け、次いで氷浴で1時間かき混ぜた。ホモジナイザーで試料にさらに数ストローク加え、次いで試料を3000×g、4分で30分間遠心した。上清を回収し、45000×g (19000rpm ローター-ss-34)、4分で1時間遠心した。上清を棄て、ペレットに50mM Tris pH 7.4、1mM EDTA、1%NP-40及びプロテアーゼインヒビターの溶液を加え、溶解ペレットを1時間氷上においた。

## 【0392】

HPLCによる膜画分の精製

[419.] RPCカラム(Pharmacia Type PLRP-S 300A)を使用して膜画分を精製した。使用緩衝液は(A) 20mM Tris pH 8.0及び(B) 60%プロパノール+DDWである。流速は1ml/分としたが、洗浄ステップだけは2ml/分とした。全手順は周囲温度で実行した。

## 【0393】

[420.] Jurkat又はKG-1膜画分の免疫沈降(IP)後の溶出試料に、緩衝液Aで1:4希釈した試

料緩衝液(62mM Tris pH 6.8、10%グリセリン、3%SDS、720mMメルカプトエタノール)を加えた。

【0394】

[421.] 試料をカラムに送り、通過液を回収した。カラムを緩衝液(A)で、流れの吸光度がゼロに下がるまで洗った。

【0395】

[422.] 次のプログラムに従ってカラムからタンパク質を溶離した: 80% (A)で5分間、次いで(A) 80-0%、(B) 20-100%のグラジエント40分間。次に第2グラジエントをかけて溶離液の組成を80% (A)とし、この組成を用いてカラムをさらに5回洗った。溶出液をフラクションコレクターで1mlずつ分画しながら回収した。

【0396】

[423.] 試料をSpeed-Vacエバポレーターで蒸発濃縮し、SDS-PAGEとウェスタンブロット解析で分析した。

【0397】

#### Q Sepharoseカラムによる正常ヒト血漿の精製

[424.] 5mlの正常ヒト新鮮凍結血漿を開始緩衝液で1:10希釈し、0.45 $\mu$ mシリンジフィルター(Sartorius, cat #16555)でろ過した。開始緩衝液はプロテアーゼインヒビター(5 $\mu$ g/mlロイペプチン、5 $\mu$ g/mlアプロチニン及び1mM PMSF)を含む20mM Tris-HClである。

【0398】

[425.] 5ml HiTrap Q Sepharoseカラム(Amersham Pharmacia, cat #17-1154-01)をP-1ペリスタポンプ(Amersham Pharmacia)に取り付けた。カラムをメーカープロトコールに従って約4ml/分の流速で洗った。希釈ろ過血漿をカラムに通し、通過液を回収した。カラムを20容積分の0.3M NaCl/開始緩衝液で洗った。タンパク質を0.6M、0.8M及び1.0M NaCl/開始緩衝液で溶離した。溶離液量はそれぞれ50、20及び20mlであった。全手順は4 で実施した。

【0399】

[426.] 溶出画分を二次元SDS-PAGEにかけ、次いでビオチニル化Y1及び陰性対照としての抗体181を使用するウェスタンブロット解析にかけた。0.6M NaCl溶出画分からはフィブリノゲン が検出された。1.0M NaCl溶出画分には補体複合体4 (CC4)、ルミカン、プロトンピン及びインター インヒビターが含まれていた。

【0400】

#### HPLCカラムによる正常ヒト血漿の精製

[427.] Q Sepharoseで精製した正常ヒト血漿を次の物質と、記載の終濃度となるよう混合した: 尿素(終濃度8M以上)、DTT(終濃度30mM)及びTFA(終濃度0.1%)。

【0401】

[428.] 精製血漿溶液を3ml RPCカラム(Amersham Pharmacia)に送り、通過液を回収した。カラムを緩衝液(A)で、流れの吸光度がゼロに下がるまで洗った。次のプログラムに従ってカラムからタンパク質を溶離した: 90% (A)で5分間、次いで(A) 90-0%、(B) 10-100%のグラジエント40分間。次に第2グラジエントをかけて溶離液の組成を90% (A)とし、この組成を用いてカラムをさらに5回洗った。使用緩衝液は(A) 0.1% TFA/DDW及び(B) 80% CANと0.1% TFA/DDWである。流速は1ml/分としたが、洗浄ステップだけは2ml/分とした。

【0402】

[429.] 溶出液をフラクションコレクターで1mlずつ分画しながら回収した。全手順を周囲温度で実施した。

【0403】

[430.] 試料をSpeed-Vacエバポレーターで蒸発濃縮し、SDS-PAGEとウェスタンブロット解析で分析した。

【0404】

#### 非標識CD162抗体との間接免疫ブロット法

【0405】

Y1受容体のウェスタンブロット解析 - ブロット後のフィルターの処理

[431.] ニトロセルロースフィルターを5%スキムミルクにより室温で1時間ブロッキングした。次いでフィルターを0.05% Tween /PBSにより室温で3回、各5分間洗った。フィルターを2%スキムミルク/PBS中、室温で1時間、Y1-ビオチン(又は181-ビオチン) 5 µg/mlとインキュベートした。次いでコールドルーム(約4~10 °C)でフィルターを冷0.05% Tween 20/PBSにより3回、各5分間洗った。次いでフィルターをコールドルームで、2%スキムミルク+0.05% Tweenで1:1000希釈したSAV-HRP(ストレプトアビジン-HRP)溶液とインキュベートした。希釈は室温(約25 °C)で行い、希釈したSAV-HRPを10~15分間氷冷してから使用した。インキュベーションは静かに攪拌しながら1時間行った。SAV-HRPとのインキュベーション後、フィルターを前述の要領で洗った。次いでフィルターをSuper Signal混合液(Pierce)と5分間、メーカープロトコールに従ってインキュベートし、次いで過剰液を乾燥除去した。フィルターをX線フィルム(富士写真フィルム)に露光した後、フィルムを現像した。

【0406】

実施例7: 組換えグリコカリシンの原核系による発現

[432.] グリコカリシン(GC、GPIb のアミノ酸1~アミノ酸493)をIPTG誘導性原核ベクターカセット中にクローニングした。この新規構築プラスミドを収めたE. coli (BL21 DE3)細胞を37 °Cで吸光度0.7~0.8まで増殖させ、次いで発現誘導用IPTGの存在下に37 °Cで3時間増殖させた。

【0407】

[433.] 半精製したヒト血小板由来グリコカリシン(GC)又は発現誘導又は非誘導細胞に由来するE. coli細胞溶解物(総体)を電気泳動した後のSDS-ポリアクリルアミドゲルを解析した。ビオチニル化Y1-scFv、ウサギ抗ヒトGCポリクローナル抗体、市販マウス抗ヒトCD42モノクローナル抗体(SZ2 Immunotech、PM640 Serotec、HIP1 Pharmigen、AN51 DAKO)及びGPIb のN末端へのポリクローナル抗体(S.C.-7071、Santa Cruz)を用いてウェスタンブロット解析を行った。

【0408】

[434.] 2つのポリクローナル抗体は細菌由来組換えグリコカリシンとヒト血小板由来天然グリコカリシンの両方を認識した。Y1-scFvと市販抗体はヒト由来天然グリコカリシンを認識したが、細菌由来組換え血小板グリコカリシンを認識しなかった(図45)。

【0409】

[435.] 原核生物(たとえばE. coli)系は翻訳後修飾機構たとえばグリコシル化及び硫酸化機構を欠く。従って、細菌に産生させたグリコカリシンをY1-scFvが認識しないことはグリコシル化や硫酸化などの翻訳後修飾がグリコカリシンへのY1-scFvの結合には不可欠であるとの結論を裏付ける。

【0410】

血液/骨髄試料に関するFACSプロトコール

[436.] 試料は病院から提供を受ける。患者試料30 µl/チューブ。5 µl/チューブのCD33-APC(AML場合)又はCD19-APC(B-CLLの場合)又はCD38-APC(多発性骨髄腫の場合)を加える。5 µl/チューブのCD45-PerCp及び5 µlのscFv-Y1又は対照scFv-N31又はCD162-PE(KPL1)を加える。チューブを4 °Cで30分間、ゆっくり振とうしながらインキュベートする。2ml PBSを加えて洗い、1200rpmで5分間遠心する。上清を棄てる。

【0411】

[437.] ワンステップアッセイの場合には次の溶解ステップに進む:

【0412】

[438.] ddH<sub>2</sub>O(患者試料に300 µl)で1:10希釈した500 µl BDリシン溶液を加える。高速でボルテックスし、4 °Cで12分間インキュベートする。前述の要領で洗う。上清を棄て500 µl PBSを加える。国際規格に従った血液試料データ収集セットアップを使用してFACSで試料を読み取る。

【0413】

[439.] 2以上のアッセイの場合：ワーキングバッファーはPBS+1% BSA+0.05%アジ化ナトリウムである。インキュベーションと洗浄は前述のとおり。

【0414】

[440.] 赤血球の溶解は本アッセイの最終ステップであり、あとは500 $\mu$ l PBSに再懸濁する。

【0415】

#### 実施例8: トライアボディーの構築

[441.] 原Y1をコードするベクターpHEN-Y1を、 $V_L$ 、 $V_H$ 両領域を個別に対象とするPCRにより増幅した。 $V_L$ -PCRにはセンス鎖オリゴヌクレオチド5'-AACTCG AGTGAG CTGACA CAGGACCCTとアンチセンス鎖オリゴヌクレオチド5'-TTTGTC GACTCA TTTCTT TTTTGC GGCCGC ACCを使用した。期待サイズ $\sim$ 350bpの産物cDNAを増幅し、配列解析し、XhoI及びNotI制限酵素で消化した。

【0416】

[442.] 同じ手順で $V_H$ 領域を増幅した(センス鎖オリゴヌクレオチド5'-ATGAAA TACCTA TTGCCT ACGGとアンチセンス鎖オリゴヌクレオチド5'-AACTCG AGACGG TGACCA GGGTAC Cを使用)。 $V_H$ -PCR産物をXhoI及びNotI制限酵素で消化した。NcoI-NotIで消化済みのpHENベクターへの三重ライゲーションを実施した。最終ベクターをpTria-Y1と命名した。

【0417】

[443.] E. coliの形質転換後、数クローンを選び出してさらなる解析によりDNA配列、タンパク質発現、細菌の細胞周辺腔からの抽出などを確認した。Y1トライアボディーのサイズの確認には還元条件下でのSDS-PAGE及びウェスタンブロット解析を行った。

【0418】

#### 実施例9: ダイアボディーの構築

[444.] 実施例8に由来するpTria-Y1ベクターをXhoI制限酵素で線状化し、2本の相補的合成オリゴヌクレオチド(5'-TCGAGA GGTGGA GGCGGTと5'-TCGAAC CGCCTC CACCTC)をプレアニール後に、Y1の重鎖と軽鎖の間のXhoI部位にライゲートした。この新しいベクターはpDia-Y1と命名した。トライアボディーの場合と同様に、DNA配列とタンパク質の発現を確認した。

【0419】

#### 実施例10: ダイアボディーとトライアボディーの発現と精製

[445.] E. coliでの発現は本質的に、scFv-Y1に関する説明と同じであった。しかし、形質転換E. coliの周辺質由来Y1ダイアボディー及びトライアボディーの精製は異なった。scFv-Y1単量体型はタンパク質A Sepharoseビーズのアフィニティーカラムで精製することができる。しかし、多量体型Y1にはこの方法での精製は無効である。そこで細菌から抽出した周辺質タンパク質を60%硫酸アンモニウムで一晩沈殿させ、 $H_2O$ に再懸濁し、 $0.1 \times$  PBSで予め平衡化したSephacryl-200 (Pharmacia)サイズ排除カラムに添加した。画分を回収し、HPLCで分析し、また二量体又は三量体を含む別個の画分を回収してFITC標識とFACS解析に回した。

【0420】

#### 実施例11: Y1ダイアボディー及びトライアボディーの細胞への結合

[446.] 「三段階染色法」を用いてJurkat細胞のFACS解析を行った。まず粗製抽出物又は精製未標識scFvを、次いでマウス抗myc抗体を、最後にFITC-又はPE-結合抗マウス抗体を、それぞれ染色した。FACS解析には、PBS+1% BSAに再懸濁した $5 \sim 8 \times 10^5$ 個の細胞が必要である。結合は4 で1時間行った。各ステップ後に細胞を洗いPBS+1% BSAに再懸濁した。最終染色ステップ後、細胞をPBS、1%BSA、2%ホルムアミドに再懸濁して固定し、次いでFACS(Becton-Dickinson)で読み取った。

【0421】

[447.] Y1-scFvの結合をダイアボディー及びトライアボディーの結合と比較した。この解析では3つのY1型すべての結合プロフィールがきわめて類似していた。これは、前述のようなY1改変がY1のリガンドへの見掛け結合アフィニティーを変更、隠蔽又は破壊しない

ことを示唆する。

【0422】

実施例12: 放射受容体測定によるKG-1細胞へのS-S Y1二量体のアフィニティーの、CONY1及びY1-IgGとの比較研究

[448.] この測定では、クロラミンTを使用してY1-IgG構成体又はBolton-Hunter(CONY1)試薬を $^{125}\text{I}$ でヨウ化して調製した放射性リガンドを使用した。測定用チューブには0.2mlあたり $5 \times 10^6$ 個のKG-1細胞と標識トレーサー+可変量の無標識競合物質とをPBS+0.1%BSA (pH 7.4)中に混ぜたものを入れた。かき混ぜながら4℃で1時間インキュベートした後、細胞を冷緩衝液で十分に洗い、放射能測定に回した。

【0423】

[449.] 放射受容体測定(RRA)には2ng/チューブの $^{125}\text{I}$ -Y1-IgGを使用し、3分子それぞれとの競合を行わせた。結果は図46のとおりである。図が示すようにS-S Y1二量体はアフィニティーが全Y1抗体の大半よりも低く(2分の1)、またCONY1よりも30倍高かった。この実験ではY1-IgGのアフィニティー概算値は $2 \times 10^{-8}\text{M}$ である。従って、対応する二量体のアフィニティーは $4 \times 10^{-8}\text{M}$ である。

【0424】

[450.] 標識CONY1を使用した第2のRRAでは、100ng/チューブの $^{125}\text{I}$ -Y1-IgGを使用し、3分子それぞれとの競合を行わせた。結果は図46のとおりである。図が示すようにS-S二量体はCONY1と比べてアフィニティーが20倍高かった。この実験ではCONY1のアフィニティー概算値は $10^{-6}\text{M}$ である。従って、対応する二量体のアフィニティーは $5 \times 10^{-8}\text{M}$ である。

【0425】

実施例13: Y1-cys-kak (システイン二量体)の生産

[451.] 1リットルの pL-yl-cys-KAK培養菌を42℃で2~3時間誘導した。培養菌を5000rpmで30分間遠心した。ペレットを180mlのTE (50mM Tris-HCl pH 7.4、20mM EDTA)に再懸濁した。8mlのリゾチーム(5mg/mlストックに由来)を加え、1時間インキュベートした。20mlの5M NaClと25mlの25% Tritonを加え、さらに1時間インキュベートした。この混合液を4℃、13000rpmで60分間遠心し、上清を棄てた。ティッシュマイザー(又はホモジナイザー)を利用してペレットをTEに再懸濁した。この手順を封入体(ペレット)が灰/茶褐色になるまで3~4回反復した。封入体を6MグアニジンHCl、0.1M Tris pH 7.4、2mM EDTAで可溶化した(1.5g-封入体/10ml-可溶化緩衝液から~10mg/mlの可溶化タンパク質を得た)。これを少なくとも4時間インキュベートした。タンパク質を濃度測定して10mg/mlの濃度とした。DTTを加えて終濃度を65mMとし室温で一晩インキュベートした。タンパク質の再生を、10mlのタンパク質を0.5Mアルギニン、0.1M Tris pH 8、2mM EDTA、0.9mM GSSGを含む溶液に滴下して希釈することにより開始した。再生溶液を~10℃で48時間インキュベートした。タンパク質を含む再生溶液を、25mMリン酸緩衝液pH 6と100mM尿素とを含む緩衝液中で透析し、500mlに濃縮した。この透析/濃縮溶液をSP-Sepharoseカラムに結合させ、NaClの(1Mまでの)グラジエントで溶出した。

【0426】

実施例14: グリコカリシン(GC)へのELISA

[452.] 100mlの精製グリコカリシンを96穴平底MaxiSorpプレートにより4℃で一晩インキュベートした。プレートをPBST (PBS+ 0.05% Tween)で3回洗い、次いで200mlのPBST-ミルク(PBST+ 2%脱脂乳)を室温で1時間にわたり添加した。プレートをPBSTで洗い、単量体又は二量体(100ml)を種々の濃度のPBST-ミルクに室温で1時間にわたり添加した。次いでプレートを洗い、(PBST-ミルクに1:100希釈した)抗 $V_L$ ポリクローナル抗体(Y1由来 $V_L$ で免疫したウサギに由来)を1時間にわたり添加した。プレートを洗い、抗ウサギHRP抗体をさらに1時間にわたり添加した。プレートを5回洗い、100 $\mu\text{l}$  TMB基質を約15分間にわたり添加し、次に100 $\mu\text{l}$ の0.5M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ を加えて反応を止めた。プレートの450nmでの吸光度をELISAリーダーで測定した。

【0427】

実施例15: 組換えグリコカリシン(GC)のE. coliによる発現

## 【0428】

[453.] scFv及び市販抗体のGCへの結合にはグリコシル化や硫酸化などの翻訳後修飾が不可欠である。原核(E. coli)系はグリコシル化や硫酸化などの翻訳後修飾機構を欠く。

## 【0429】

実施例15: Y1四量体の生産

[454.] Y1のC末端にPCRにより配列LNDIFEAQKIEWHEを付加した構成体を消化して、IPTG誘導性発現ベクターカセットにクローニングした。このクローンはY1-Biotagと命名した。この配列は酵素BirAの基質であり、該酵素は遊離ビオチンの存在下にビオチンをリシン(K)残基に共有結合させることができる(Altman JD et al., 「抗原特異的Tリンパ球の表現型分析」Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. Science, 1996 Oct 4, 274 (5284): 94-6)。この構成体はBL21細菌細胞で封入体として産生された。タンパク質の再生を前述の要領で行った。封入体をグアニジン-DTTで可溶化した。再生はアルギニン-トリス-EDTAを含む緩衝液による希釈によって行った。透析、濃縮の後、HiTrapQイオン交換カラムで精製した。

## 【0430】

[455.] 精製Y1-biotag scFvをBirA酵素(Avidityより購入)及びビオチンと、メーカーの助言に従ってインキュベートした。ビオチニル化Y1-biotagを(分子あたりビオチン量を推計する)HABA試験で分析すると、およそ>0.8ビオチン残基/分子の存在が判明した。

## 【0431】

[456.] ビオチニル化Y1-biotagをストレプトアビジン-PE(フィコエリトリン)とインキュベートして複合体を形成し、また(Y1陽性)KG-1細胞によるFACS実験に使用した。結合感度はアビディティーの上昇により少なくとも100倍増大した。ストレプトアビジンからは4つのビオチニル化Y1-biotag分子が形成されうる。

## 【0432】

[457.] Y1-biotagの配列(SEQ ID NO:211)は次のとおりである:

```

1      MEVQLVESGG GVVRPGGSLR LSCAASGFTF DDYGMSWVRQ
41     APGKGLEWVS GINWNGGSTG YADSVKGRFT ISRDNAKNSL
81     YLQMNSLRAE DTAVYYCARM RAPVIWGQGT LVTVSRGGGG
121    SGGGSGGGG SSELTQDPAV SVALGQTVRI TCQGDSLRSY
161    YASWYQQKPG QAPVLVIYGK NNRPSGIPDR FSGSSSGNTA
201    SLTITGAQAE DEADYYCNSR DSSGNNVVFV GGTKLTVLGG
241    GGLNDIFEAQ KIEWHE

```

## 【0433】

実施例16: Y17活性の解析

[458.] Pastoral haemolytical由来しヒト血小板GPIbを選択的に切断する酵素、0-シアロ糖タンパク質エンドプロテアーゼを使用して、GPIbへのY17の結合特異性の評価を試みた。0-シアロ糖タンパク質エンドプロテアーゼはシアリル化した0結合型グリカンを含むタンパク質だけを特異的に切断し、N結合型糖タンパク質又は非グリコシル化タンパク質を切断しない。この酵素は、高度に0-グリコシル化したGPIbを切断するがGPIIb-IIIaや血小板表面の他受容体は切断しないと報告されている。免疫プロット解析やFACS解析で示されたように、GPIbを切断した0-シアロ糖タンパク質エンドプロテアーゼを洗浄血小板とインキュベートするとY17も、GPIbへのモノクローナル抗体(MCA466S、Serotec)も、GPIbに結合しなくなる。これらのエンドプロテアーゼはGPIIb/IIIaへの(抗CD61)モノクローナル抗体の結合能には変化を及ぼさなかった(図4)。

## 【0434】

実施例17: 血小板GPIb上のY17エピトープの同定

[459.] 血小板GPIb上のY17エピトープの同定への興味深いアプローチでは、血小板GPIb上の切断部位が十分に解明されているエンドプロテアーゼ酵素を使用する。

## 【0435】

17.1: Y1エピトープ・マッピングへのモカラギンの効果

[460.] コブラ毒メタロプロテイナーゼのモカラギンは血小板GPIb を、残基glu-282とasp-283の間の単一部位で特異的に切断し、2つの安定生成物すなわち上清中に検出される45kDaのN末端側断片(His-1~Glu-282)と膜に結合した100kDaのC末端側断片を生成する。

【0436】

[461.] 洗浄血小板をモカラギンで処理し、血小板溶解物をSDS-PAGEで分離しニトロセルロースに転写した。モカラギン処理した洗浄血小板のY1によるウェスタンブロット解析から、GPIb(135 kDa)に対応するバンドが消失し、N末端側45kDaトリプシン消化断片にY-17が結合していることが判明した。GPIb のC末端側断片へのモノクローナル抗体MCA466SはC末端側100kDa断片と反応する一方で、GPIb のN末端を認識するモノクローナル抗体S.C.7071はY1が認識したのと同じN末端側45kDa断片と反応した(図14)。

【0437】

[462.] グリコカリシンのモカラギン処理は洗浄血小板で観測された結果と同様の結果をもたらすが、それはY1とモノクローナル抗体S.C.7071がGPIb のN末端側45kDa切断断片に結合することを示す(図8)。これらの結果はY17に対応するエピトープが配列His-1~Glu-282内に含まれていることを示唆する。

【0438】

17.2: Y17エピトープ・マッピングへのカテプシンGの効果

[463.] 好中球セリンプロテアーゼのカテプシンGはグリコカリシンを、残基Leu-275とTyr-276の間及び残基Val-296とLys-297の間の2つの部位で切断した。グリコカリシンをカテプシンGで処理すると2つのN末端側断片すなわち小さいほうの42kDa断片(His1~Leu275)と大きいほうの45kDa断片(His1~Val296)、それに1つのC末端側~95kDa断片が生成する。グリコカリシンとカテプシンG消化で生成したグリコカリシン断片とをSDS-PAGEで分離し、ニトロセルロースに転写した。Y17は大きいほうの断片(His1~Val296)に結合したが、小さいほうの断片(His1~Leu275)には結合しなかった。さらに、His1~Leu275内のエピトープを認識するモノクローナル抗体S.C.7071は両断片をプロットした(図12)。モカラギン及びカテプシンGによるN末端側消化断片の解析結果は、GPIb のアミノ酸配列Tyr276~Glu282がY17結合のための重要な認識モチーフであることを示唆する。

【0439】

実施例18: vWF依存凝集反応へのY17-scFvの効果

[464.] vWF依存の血小板凝集反応へのY17-scFvの効果を種々のY17濃度で試験した。Y1とは対照的に、Y17は10、25又は50 µg/mlの終濃度ではリストセチン誘発性のvWF依存洗浄血小板凝集反応を阻害しなかった。モカラギン及びカテプシンGによるN末端側消化断片の解析結果は、GPIb のアミノ酸配列Tyr276~Glu282がY17及びY1結合のための重要な認識モチーフであることを示唆する。Y17は血小板凝集を阻害しないので、Y1とY17は同じ配列にではなく重複した配列に結合する模様である。

【図面の簡単な説明】

【図1】

[121.] 図1はGPIbの鎖上の、エンドプロテアーゼ類による切断部位を示す。

【図2】

[122.] 図2は還元及び非還元条件下での血小板へのY1及びY17の結合を示すウェスタンブロット解析の結果である。

【図3】

[123.] 図3は血小板GCの各種調製物とKG-1細胞の膜画分4とのY1の反応性の概略図である。

【図4】

[124.] 図4は0-シアロ糖タンパク質エンドプロテアーゼで血小板GPIbを切断するとY1、Y17両方が結合しなくなることを示すウェスタンブロット解析の結果である。

【図5】

[125.] 図5はY1とY17が0-シアロ糖タンパク質エンドプロテアーゼによる切断後の類似のグリコカリシン断片に結合することを示すウェスタンブロット解析の結果である。

## 【図 6】

[126.] 図6はGPIbの特異的タンパク質分解によりY1が血小板に結合しなくなることを示すFACS解析の結果である。

## 【図 7】

[127.] 図7はモカラギン切断後の血小板GPIb のN末端側断片(His1-Glu282)へのY1の結合を示すウェスタンブロット解析の結果である。

## 【図 8】

[128.] 図8はモカラギン切断後のグリコカリシンへのY1とY17の結合を示すウェスタンブロット解析の結果である。

## 【図 9】

[129.] 図9は血小板へのY1とY17の結合を示すウェスタンブロット解析の結果である。

## 【図 10】

[130.] 図10はフィシン(Ficin)分解後のグリコカリシンにY1とY17が同様に結合することを示すウェスタンブロット解析の結果である。

## 【図 11】

[131.] 図11はY1がGPIba のカテプシンG切断で生成した大きいほうの断片と反応することを示すウェスタンブロット解析の結果である。

## 【図 12】

[132.] 図12はY1とY17がGPIba のカテプシンG切断で生成した大きいほうの断片と反応することを示すウェスタンブロット解析の結果である。

## 【図 13】

[133.] 図13はグリコカリシンをモカラギンとカテプシンGで切断するとY1が結合しなくなることを示すウェスタンブロット解析の結果である。

## 【図 14】

[134.] 図14はモカラギンとカテプシンGで切断した洗浄血小板溶解物へのY1とY17の結合を示すウェスタンブロット解析の結果である。

## 【図 15】

[135.] 図15は洗浄血小板の凝集反応のY1-scFvによる阻害を示すグラフである。

## 【図 16】

[136.] 図16は多血小板血漿中の血小板凝集のY1-scFvによる阻害を示すグラフである。

## 【図 17】

[137.] 図17は洗浄血小板の凝集反応のY1-IgGによる誘発を示すグラフである。

## 【図 18】

[138.] 図18は多血小板血漿中の血小板凝集のY1-IgGによる誘発を示すグラフである。

## 【図 19】

[139.] 図19はELISA法の結果である。

## 【図 20】

[140.] 図20はY1及び -CD42 (N1-19)の、それぞれのリガンドへの結合の特異性を示すウェスタンブロット解析の結果である。

## 【図 21】

[141.] 図21は免疫沈降法とRP-HPLCを用いて精製したKG-1細胞膜上のY1-リガンドとのY1の反応性を示すウェスタンブロット解析の結果である。

## 【図 22】

[142.] 図22はY1結合へのO-シアロ糖タンパク質エンドプロテアーゼ切断の効果を示すウェスタンブロット解析の結果である。

## 【図 23】

[143.] 図23はRP-HPLC精製KG-1細胞溶解物及びヘパリン-BSAへのY1結合へのアリアルスルファターゼ切断の効果を示すウェスタンブロット解析の結果である。

## 【図 24】

[144.] 図24はY1結合の特異性の解析に使用した免疫沈降法の概要である。

【図25】

[145.] 図25はY1及び抗CD162抗体の、AML患者由来細胞及び正常血液由来細胞への結合を比較したウェスタンブロット解析の結果である。

【図26】

[146.] 図26は抗体KPL1、PL1及びPL2のY1との競合的結合能を示すFACS解析の結果である。

【図27】

[147.] 図27はY1結合の特異性を示すFACS解析の結果である。

【図28】

[148.] 図28もまたY1結合の特異性を示すFACS解析の結果である。

【図29】

[149.] 図29は各種ペプチドの存在下でのY1結合阻害率を示すグラフである。

【図30】

[150.] 図30は異なる処置群のマウスの肝重量を示すグラフである。

【図31】

[151.] 図31は異なる処置群のマウスの骨髄中MOLT細胞率を示すグラフである。

【図32】

[152.] 図32は異なる処置群のマウスの血中MOLT細胞率を示すグラフである。

【図33】

[153.] 図33は、Y1結合に対するアリール・スルファターゼとMocarhagin解裂の効果を示すウェスタン・ブロットを表す。

【図34】

[154.] 図34は35日目のマウス肝重量(平均±SEM)を示すグラフである。

【図35】

[155.] 図35は処置の生存効果を示すグラフである。

【図36】

[156.] 図36は異なる処置群の白血病発生率を示すグラフである。

【図37】

[157.] 図37は異なる処置群の血中KG-1細胞率を示すグラフである。

【図38】

[158.] 図38は実験動物の骨髄中KG-1細胞率を示すグラフである。

【図39】

[159.] 図39はマウスへの<sup>125</sup>I-CONY1静注後の血漿中TCA沈殿放射能の薬物動態を示すグラフである。CONY1の配列はSEQ ID NO: 204として示す。

【図40】

[160.] 図40はマウスへの<sup>125</sup>I-CONY1静注後の種々の器官/組織の比放射能を示すグラフである。

【図41】

[161.] 図41はマウスへの<sup>125</sup>I-CONY1静注後の種々の器官/組織の放射能分布を示すグラフである。

【図42】

[162.] 図42はY1-cys-kakのSuperdex 75カラム溶出プロフィールである。

【図43】

[163.] 図43は還元、非還元条件下での単量体と二量体のサイズ比較である。

【図44】

[164.] 図44はIgG-Y1分子とscFv-Y1の結合レベルの比較を示すFACS解析結果である。

【図45】

[165.] 図45はY1及び他抗体の、天然ヒト血小板由来グリコカリシン及びE. coli産生組換えグリコカリシンへの結合レベルを示すウェスタンブロット解析の結果である。

## 【図 4 6】

[166.] 図46はY1単量体、Y1 scFv (CONY1)及びY1 IgGの結合比較である。

## 【図 4 7】

[167.] 図47はY1ジスルフィド結合二量体とY1 scFv (CONY1)の結合比較である。

## 【図 4 8】

[168.] 図48はY1-IgGの重鎖(HC)と軽鎖(LC)のアミノ酸/ヌクレオチド配列である。Y1-HCのヌクレオチド配列のオープンリーディングフレーム(ORF)(SEQ ID NO: 205)、Y1-HCのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 206)、Y1-LCのヌクレオチド配列のORF (SEQ ID NO: 207)及びY1-LCのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 208)を示す。

## 【図 4 9】

[169.] 図49はTM1のアミノ酸配列(SEQ ID NO: 209)である。

## 【図 5 0】

[170.] 図50はY16 scFvのアミノ酸/ヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 210)である。

## 【図 5 1】

[171.] 図51はY1 Biotagのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 211)である。

## 【図 5 2】

[172.] 図52はY1-cys-KAK scFvのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 212)である。

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 3 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 33】

FIG. 33

RP-HPLC#4(KG1)に結合するY1に対する  
アリール-スルファターゼ及びMocarhagin処理の効果

