

【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23年4月21日(2011.4.21)

【公表番号】特表2008-507951(P2008-507951A)

【公表日】平成20年3月21日(2008.3.21)

【年通号数】公開・登録公報2008-011

【出願番号】特願2006-543403(P2006-543403)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/02 (2006.01)

C 0 7 K 16/18 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 K 47/48 (2006.01)

G 0 1 N 33/574 (2006.01)

G 0 1 N 33/577 (2006.01)

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 15/00 C

C 0 7 K 16/18

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/00 A

C 1 2 N 5/00 B

A 6 1 K 37/02

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 47/48

G 0 1 N 33/574 A

G 0 1 N 33/577 B

C 1 2 P 21/08

【誤訳訂正書】

【提出日】平成23年3月2日(2011.3.2)

【誤訳訂正 1】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】腺癌特異的抗体 S A M - 6 およびその用途

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本発明は癌の診断と処置、より詳しく述べると、哺乳動物、例えばヒトの腫瘍の診断、検査、モニターおよび治療に有用である抗体などのポリペプチドに関する。

【0002】

医療分野における最近の進歩によって、癌の患者の生存率が極めて改善されてはいるが、癌に関連する疾病に基づく死亡者の多くの方々を腫瘍の早期診断によって防止する。したがって、最初に診断をした際に、多数の患者が既に疾病の最終段階に達しているのである。

【0003】

女性たちの凡そ75%は病勢が進んだ段階（第Ⅲ期または第Ⅳ期）に達した後に卵巣癌であると診断される。なぜなら、卵巣癌の症状は曖昧であるか、または“無症状”であるからである。極めて積極的な外科的治療手段と新規な化学療法であっても、進行した段階に入っている卵巣の癌をわずらっている女性の生存年数は約15%が5年を超えることがないというのが、過去30年以上、変わることが無いのである。これを言い換えるならば、卵巣に癌が出来ていると診断された（第1期）の女性の凡そ90%は5年間生存できるというわけである。

【0004】

腫瘍（例えば、肺の腺癌、扁平細胞肺癌腫、腸管型胃の腫瘍、びまん性胃癌、結腸の腺癌、前立腺の腺癌、胸部の小葉腫瘍、胸部の腺管癌、膵臓の腺癌、卵巣の腺癌または子宮の腺癌）の早期で改善された医学的検出と処置とが必要なことは明らかで、それによって腫瘍の処置の機会を増し、長期生存に関する優れた予後へと導くのである。

【0005】

発明の概要

本発明者らは、腫瘍性の細胞に特異的なエピトープに反応するSAM-6と呼ぶポリペプチドを発見したのである。このポリペプチドは極めて優秀な診断上の手段となるものであるばかりか、細胞の増殖を抑え、脂質の細胞内蓄積を誘導し、細胞に結合している腫瘍性の細胞類をアポトーシスさせる。これらの性質により、従来の治療薬の多くがもつ副作用のない、腫瘍性疾患の治療に用いうる。

【0006】

本発明は腫瘍の診断や治療に利用することができるモノクローナル抗体などのポリペプチドを特徴とするものである。したがって、本発明の第一の態様においては、腫瘍細胞に結合する精製ポリペプチドを特色とするもので、そのポリペプチドはアミノ酸配列順がSEQ ID NO: 1とSEQ ID NO: 3と実質的に同一であって、そのポリペプチドは特にBXP C-3（ATCC受託番号No. CRL-1687）細胞23132/87（DSMZ受託番号No. ACC201）細胞、COLO-206F（DSMZ受託番号No. ACC21）細胞、COLO-699（DSMZ受託番号No. ACC196）細胞とLOU-NH91（DSMZ受託番号No. ACC393）細胞と特異的に結合するが、非腫瘍性の細胞には結合しない。

【0007】

第二の態様では、本発明は腫瘍性の細胞に結合している精製ポリペプチドを特色とするものであって、このポリペプチドはSEQ ID NO: 1とSEQ ID NO: 3の配列と実質的に同一のアミノ酸配列をもっており、前記ポリペプチドは、BXP C-3（ATCC受託番号No. CRL-1687）細胞23132/87（DSMZ受託番号No. ACC201）細胞、COLO-206F（DSMZ受託番号No. ACC21）細胞、COLO-699（DSMZ受託番号No. ACC196）細胞とLOU-NH91（DSMZ受託番号No. ACC393）細胞と特異的に結合し、非腫瘍性の細胞には結合せず、また前記腫瘍性の細胞は、肺の腺癌、扁平細胞肺癌、腸管型胃癌、びまん性胃癌、結腸の腺癌、前立腺の腺癌、食道の扁平細胞癌腫、食道の腺癌、胸部の消化管小葉癌腫、胸部の管の癌腫、膵臓の腺癌、卵巣の腺癌および子宮の腺癌である。

【0008】

第三の態様では、本発明は腫瘍性の細胞に結合する精製ポリペプチドを特徴とし、前記が

リペプチドはSEQ ID NO: 1とSEQ ID NO: 3の配列と実質的に同一のアミノ酸配列を具備し、前記ポリペプチドは肺の腺癌，扁平細胞肺癌，腸管型胃の腺癌，びまん性胃癌，結腸の腺癌，前立腺の腺癌，食道の扁平癌腫，食道の腺癌，乳房の無定形状癌腫，乳房の管の癌腫，膵臓の腺癌，卵巣の腺癌および子宮の腺癌と結合し、非腫瘍物の細胞とは結合しない。

【0009】

本発明の以上の好ましい三つの実施態様において、ポリペプチドが腫瘍性の細胞に結合すると細胞の増殖を抑制するが、非腫瘍性細胞の増殖は抑制しない。

【0010】

本発明の前記最初の三つの実施態様のうちの第2番目の好ましい態様においては、ポリペプチドは低比重リボタンパク(LDL)および/または酸化低比重リボタンパク(oxLDL)に結合し、および/または超低比重リボタンパク(VLDL)に結合し、腫瘍性の細胞に結合すると、脂質が細胞内に蓄積するようになるが非腫瘍性細胞に脂質の細胞内蓄積を招くことはない。

【0011】

本発明の前記最初の三つの実施態様の第3番目の好ましい実施態様においては、ポリペプチドはこれが結合する腫瘍性の細胞のアポトーシスを誘導するが、非腫瘍性細胞のアポトーシスを誘導することはない。

【0012】

本発明の前記最初の三つの態様の第4番目の好ましい実施態様においては、ポリペプチドは抗体またはその機能的なフラグメントを包含する。例えば機能的なフラグメントは V_L 、 V_H 、 F_v 、 F_c 、 Fab 、 Fab' および $F(ab')_2$ から成っている群中から選択することができる。更に、機能的なフラグメントにはSEQ ID NO: 1および/または3の配列と実質的に同一であるか、或はSEQ ID NO: 1および/または3の配列のフラグメントを含むことができる。

【0013】

本発明の前記最初の三つの態様の第5番目の好ましい実施態様においては、ポリペプチド核酸配列の相補性決定的領域(CDRs)は軽鎖の可変領域(V_L)のSEQ ID NO: 2のヌクレオチド67-99(CDR1)、145-165(CDR2)および262-288(CDR3)と実質的に同一の核酸配列を含む。さらに、ポリペプチド核酸配列の相補性の決定的領域(CDRs)は重鎖の可変領域(V_H)のSEQ ID NO: 4のヌクレオチド91-105(CDR1)、148-198(CDR2)および295-330(CDR3)と実質的に同一の核酸配列を含む。

【0014】

本発明の前記第4番目の態様はアミノ酸配列SEQ ID NO: 1またはアミノ酸配列SEQ ID NO: 3を含む精製ポリペプチドを特徴とする。

【0015】

第5番目の態様においては、本発明はSEQ ID NO: 1および3のアミノ酸配列を含む精製ポリペプチドを特徴とする。

【0016】

本発明の前記最初の第5番目の態様の最初の実施態様では、ポリペプチド配列の相補性決定領域(CDRs)が軽鎖(V_L)可変領域のSEQ ID NO: 1のアミノ酸配列Ser-Gly-Asp-Lys-Leu-Gly-Asp-Lys-Tyr-Ala-Cys(CDR1)、Gln-Asp-Ser-Lys-Arg-Pro-Ser(CDR2)、およびGln-Ala-Trp-Asp-Ser-Ser-Ile-Val-Val(CDR3)と実質的に同一のアミノ酸配列を含む。さらに、ポリペプチドアミノ酸配列の相補性決定領域(CDRs)は重鎖(V_H)の可変領域のSEQ ID NO: 3のアミノ酸配列Ser-Tyr-Ala-Met-His(CDR1)、Val-Ile-Ser-Tyr-Asp-Gly-Ser-Asn-Lys-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Ser-Val-Lys-Gly(CDR2)とAsp-Arg-Leu-Ala-

Val - Ala - Gly - Lys - Thr - Phe - Asp - Tyr (CDR3) と実質的に同一のアミノ酸配列を含む。

【0017】

本発明の前記最初の第5番目の態様の第二の好ましい実施態様では、ポリペプチドは単クローン性の抗体、例えばヒトの単クローン性の抗体である。

【0018】

第6番目の態様では、本発明は第1番目の態様のポリペプチドを発現する細胞を特徴とし、第8番目の態様では、本発明は第2番目のポリペプチドを発現する細胞を特徴とし、第9番目第3番目の態様のポリペプチドを発現する細胞を特徴とする。

【0019】

本発明の第7番目の態様においては、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列と実質的に同一の配列を含むポリペプチドを発現する細胞を特徴とするものである。

【0020】

本発明の第8番目の態様においては、SEQ ID NO: 3のアミノ酸配列と実質的に同一の配列を含むポリペプチドを発現する細胞を特徴とするものである。

【0021】

本発明の第9番目の態様においては、SEQ ID NO: 1または3のアミノ酸配列と実質的に同一の配列を含むポリペプチドを発現する細胞を特徴としており、この態様に関する好ましい実施例においては、ポリペプチドはSEQ ID NO: 1または3、或はSEQ ID NO: 1と3との両者の配列を含んでいる。

【0022】

第10番目の態様においては、本発明は前記第6番目の態様による細胞を生成する方法を特徴としている。この方法は次の段階から成っている。即ち、(a) リンパ球とヘテロミエローム細胞との融合もたらし、融合がハイブリドーマをもたらし条件下で、リンパ球とヘテロミエローム細胞株を接触させ、(b) 前記ハイブリドーマが、ポリペプチドが結合する腫瘍細胞の増殖を抑制するが、非腫瘍性細胞中では増殖を抑制しないポリペプチドを産生するか否かを決定し、(c) ハイブリドーマが、BXP C-3 (ATCC 受託番号 No. CRL-1687), 23132/87 (DSMZ 受託番号 No. ACC201), COLO-206F (DSMZ 受託番号 No. ACC21), COLO-699 (DSMZ 受託番号 No. ACC196) および LOU-NH91 (DSMZ 受託番号 No. ACC393) の細胞の少くとも一種に特異的に結合するが、非腫瘍性の細胞には結合しないポリペプチドを産生するか否かを決定する。

【0023】

第11番目の態様の特徴は前記第7番目の態様の細胞を発生する方法に関するものである。この方法は次の諸段階、即ち、(a) リンパ球とヘテロミエローム細胞との融合もたらし、融合がハイブリドーマをもたらし条件下で、リンパ球とヘテロミエローム細胞株を接触させ、(b) 前記ハイブリドーマが、ポリペプチドが結合する腫瘍細胞中の脂質の細胞内蓄積を誘導するが、非腫瘍性細胞中では脂質の細胞内蓄積を誘導しないか否かを決定し、(c) ハイブリドーマが、BXP C-3 (ATCC 受託番号 No. CRL-1687), 23132/87 (DSMZ 受託番号 No. ACC201), COLO-206F (DSMZ 受託番号 No. ACC21), COLO-699 (DSMZ 受託番号 No. ACC196) および LOU-NH91 (DSMZ 受託番号 No. ACC393) の細胞の少くとも一種に特異的に結合するが、非腫瘍性の細胞には結合しないポリペプチドを産生するか否かを決定する。

【0024】

第12番目の態様の特徴は前記第9番目の態様の細胞を発生する方法に関するものである。この方法は次の諸段階、即ち、(a) リンパ球とヘテロミエローム細胞との融合もたらし、融合がハイブリドーマをもたらし条件下で、リンパ球とヘテロミエローム細胞株を接触させ、(b) 前記ハイブリドーマが、ポリペプチドが結合する腫瘍細胞中のアポトーシスを誘導するが、非腫瘍性細胞中ではアポトーシスを誘導しないか否かを決定し、(c)

ハイブリドーマが、B X P C - 3 (A T C C 受託番号 N o . C R L - 1 6 8 7) , 2 3 1 3 2 / 8 7 (D S M Z 受託番号 N o . A C C 2 0 1) , C O L O - 2 0 6 F (D S M Z 受託番号 N o . A C C 2 1) , C O L O - 6 9 9 (D S M Z 受託番号 N o . A C C 1 9 6) および L O U - N H 9 1 (D S M Z 受託番号 N o . A C C 3 9 3) の細胞の少くとも一種に特異的に結合するが、非腫瘍性の細胞には結合しないポリペプチドを産生するか否かを決定する。

【 0 0 2 5 】

本発明の第 1 3 番目の態様では、哺乳動物、例えばヒトの腫瘍を診断する方法に関する本発明の最初の 5 つの態様のいずれかの態様の精製ポリペプチドを用いるものを特徴とする。この方法には次に述べる段階がある。即ち、(a) 本発明の最初の第 1 3 番目の態様中のいずれかの一つの態様の精製ポリペプチドを哺乳動物の細胞または組織試料と接触し、そして (b) 精製ポリペプチドが細胞または組織試料に結合するか否かを検出するものであって、精製ポリペプチドが細胞または組織試料に結合すれば、その哺乳動物は腫瘍を有することを指示するものである。

【 0 0 2 6 】

本発明の第 1 3 番目の好ましい態様では、腫瘍は肺の腺癌，扁平細胞肺癌，腸型胃癌，びまん性胃癌，結腸の癌，前立腺の癌，食道の鱗状細胞癌腫，食道の癌，胸部の小葉の癌腫，胸部の管の癌腫，膵臓の腺癌，卵巣の腺癌，または子宮の腺癌である。この態様の更に好ましい態様においては、ポリペプチドは抗体またはポリペプチドを、放射性核種，蛍光マーカー，酵素，細胞毒素，サイトカインおよび成長抑制物質から成る種類の中から選択された検出能物質に結合することができる。この態様における更に好ましい態様においては、ポリペプチドは抗体であるか、或は放射性核種，蛍光標識，酵素，細胞毒素，サイトカイン及び成長抑制物質から成る群の中から選択された検出物質とコンジュゲートされている。更に、ポリペプチドはタンパク質精製タグ例えば、裂開性タンパク質精製タグにコンジュゲートすることができる。

【 0 0 2 7 】

本発明の第 1 4 番目の態様においては、本発明は、その最初に述べた 5 種類の態様中の、いずれかの一つの態様の精製ポリペプチドを哺乳動物、例えばヒトの増殖性疾患を治療する方法に使用することを特徴とするものである。この方法には、細胞試料を前記態様の最初の 7 種類のうちの、いずれかの一つの精製ポリペプチドと接触される段階を含んでいて、細胞に精製ポリペプチドを結合することによって、その細胞の増殖性を減少する。

【 0 0 2 8 】

本発明の第 1 4 番目の態様の中の好ましい複数の実施態様において、増殖性疾患は肺の腺癌，扁平肺癌腫，本能型胃癌，びまん性胃癌，結腸の腺癌，前立腺の腺癌，食道の扁平細胞癌腫，食道の腺癌，乳房の小葉の癌，胸の管の癌腫，膵臓の腺癌，卵巣の腺癌、そして子宮の腺癌である。この実施態様の好ましい態様は、更に、抗体或はポリペプチドが放射性核種，蛍光マーカー，酵素，細胞毒素，サイトカインおよび成長抑制物質から成る群から選択された検出物質とコンジュゲートしている。望ましい検出物質は細胞のアポトーシスを誘導するものである。更に、ポリペプチドはタンパク質精製タグ、例えば裂開性タンパク質精製タグにコンジュゲートさせることが出来る。

【 0 0 2 9 】

第 1 5 番目の態様において、本発明は哺乳動物、例えばヒトの増殖性障害を処理する方法に、その最初の五つの態様のいずれかの精製ポリペプチドを使用することにある。この方法は細胞を、本発明の最初の七つの態様のいずれかの精製ポリペプチドと接触させる段階を必要としている。

【 0 0 3 0 】

本発明の第 1 6 番目の望ましい態様では、増殖性疾患は胃の腺癌，結腸直腸の腺癌，扁平細胞肺癌，肺腺癌，食道の扁平細胞癌腫，膵臓の腺癌，膀胱の尿路癌，腎臓の腎性細胞の尿路上皮癌，腎臓の腎性細胞の腎性細胞癌腫，前立腺の腺癌，乳房の管路癌腫，乳房の小葉癌腫，卵巣の腺癌，子宮内膜の腺癌，そして子宮の腺癌である。なお、この態様におけ

る更に好ましい実施態様は、ポリペプチドが抗体であるか、或はポリペプチドが放射性核種、蛍光マーカー、酵素、細胞毒素、サイトカインおよび成長抑制物質から成る群から選択された検出能物質にコンジュゲートされている。好ましくは、検出能物質は細胞の細胞増殖を抑制できるものである。更に、ポリペプチドはタンパク質精製タグ、例えば裂開性タンパク質精製タグにコンジュゲートさせることが出来る。

【0031】

第17番目の態様において、本発明は哺乳類、例えばヒトの増殖性疾患を治療する方法に関する、本発明の前記最初の5つの態様のいずれかの一種の精製ポリペプチドを用いることを特徴とするものである。この方法は細胞を、本発明の最初に述べた七種類の態様のうちの任意の精製ポリペプチドと細胞とを接触する手段を包含している。そこで、精製ポリペプチドを細胞と結合すると、前記細胞をアポトーシスさせる。

【0032】

本発明の第18番目の好ましい態様においては、増殖性疾患は胃癌、結腸大腸、腸の腺癌、扁平細胞肺癌、肺の腺癌、食道の扁平細胞癌、膵臓の腺癌、膀胱の尿路上皮癌、腎臓の腎性細胞癌、前立腺の腺癌、胸部の管の癌、卵巣の腺癌、子宮内膜の腺癌、子宮の腺癌である。この第18番目の態様に関する更に好ましい態様はポリペプチドが抗体であるか、或はポリペプチドは放射性核種、蛍光マーカー、酵素、細胞毒素、サイトカイン、そして成長抑制因子から成るものから選択された検出能物質に結合されている。好ましくは、検出能物質は細胞の細胞増殖を抑制できるものである。更に、ポリペプチドはタンパク質精製タグ、例えば裂開性タンパク質精製タグにコンジュゲートさせることが出来る。

【0033】

本発明の第19番目の態様では、細胞の増殖を阻止する薬剤の製造のための、医薬上許容できる担体中に本発明の前記最初の五つの態様のいずれかの精製ポリペプチドを含有する薬剤でヒトの体内の腫瘍性細胞を治療することを特徴とする。

【0034】

本発明の第20番目の態様においては、脂質の細胞内蓄積を誘導する薬剤の製造のための、医薬上許容することが出来る担体中に本発明の前記最初に述べた5つの態様のうちのそれぞれの精製ポリペプチドを含有する医薬によりヒト体内の腫瘍性細胞を治療することを特徴とする。

【0035】

本発明の第21番目の態様においては、アポトーシスを行う薬剤を製造するための、医薬上許容することの出来る担体中に本発明の前記最初の五つの態様のいずれかの精製ポリペプチドを含有する薬剤を用いてヒト体内の腫瘍性細胞を治療することを特徴とするのである。

【0036】

本発明の第22番目の態様は、ヒト体内の腫瘍性細胞のすべての増殖を阻止し、脂質の細胞内蓄積を誘導し、アポトーシスを誘導する薬剤の製造のための、医薬上許容することの出来る担体中に最初に述べた5つの態様のいずれかの精製ポリペプチドを含有する薬剤を用いてヒト体内の腫瘍性細胞を治療することを特徴とするものである。

【0037】

本発明の第23番目の態様では、本発明は前記最初に挙げた五つの態様のいずれかの精製ポリペプチドを含有する診断上の薬品を提供することを特徴とするものである。

【0038】

本発明の第24番目の態様においては、SEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 4の配列を含む単離された核酸分子を特徴とするものである。

【0039】

本発明の第25番目の態様においては、本発明はベクター、例えばプラスミドまたはウイルス発現ベクターであって、本発明の第24番目の態様の核酸分子を含有するものを特徴とするものである。さらに、ベクターは哺乳動物細胞、たとえばヒト細胞中に含有されていてもよい。

【 0 0 4 0 】

定義

「検出可能物質」とは検出を促進する診断上の物質に結合されている化合物のことである。このような「検出可能物質」は診断上の物質に結合されている共有結合または非共有結合のものである。更に、結合は直接または間接の結合である。「検出可能物質」の例を挙げると、タンパク質精製タグ，細胞毒素，酸素，常磁性のラベル，酵素基質，補助因子，酵素阻害剤，色素，放射性核種，化学ルミネッセントラベル，蛍光マーカー，成長阻害剤，サイトカイン，抗体，ビオチンが挙げられる。

【 0 0 4 1 】

「診断剤」とは、この明細書に記載する効力検定、並に当該技術において標準である他の手段のいずれかを利用して腫瘍性の細胞を検出するのに用いることが出来る化合物のことである。「診断剤」の例を挙げると、次のものがある。次の細胞、即ち、B X P C - 3 (A T C C 受託番号 C R L - 1 6 8 7) , 2 3 1 3 2 / 8 7 (D S M Z 受託番号 A C C 2 0 1) , C O L O - 2 0 6 F (D S M Z 受託番号 A C C 2 1) , C O L O - 6 9 9 (D S M Z 受託番号 A C C 1 9 6) または L O U - N H 9 1 (D S M Z 受託番号 A C C 3 9 3) の少くとも一つに特異的に結合するが、非腫瘍性細胞とは結合しない抗体である。更に、「診断物質」はそれが腫瘍性細胞に結合する時にだけ細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導し、あるいはその両方を行うが、非腫瘍性細胞ではこれを行わない。

【 0 0 4 2 】

「診断剤」で検出できる腫瘍性の細胞の例を挙げると、肺の腺癌，扁平細胞肺癌，腸管型胃癌，びまん性胃癌，結腸の腺癌，前立腺の腺癌，食道の鱗状細胞の癌，食道の腺癌，胸部の小葉癌，胸部の管の癌，膵臓の腺癌，卵巣の腺癌或は子宮の腺癌がある。更に、「診断剤」とは、例えばペプチド，ポリペプチド，合成有機分子，天然有機分子，核酸分子およびそれらの成分、さらに診断剤と共有結合または非共有結合した一種もしくは数種の検出物質を含む。

【 0 0 4 3 】

前記ポリペプチドに関連して使用した「機能的断片」とは、全長 (f u l l - l e n g t h) ポリペプチドの少くとも生物学的活性を保持する断片をいう。この生物学的活性の例を挙げると、特に抗原に結合する能力を備え、アポトーシスおよび/または細胞増殖抑制能力を備えている。これらの生物学的活性は、例えば、本発明において述べる効力検定手段のいずれかを利用して決定することが出来る。

【 0 0 4 4 】

抗体の機能的断片の例を挙げると、 V_L , V_H , F_v , F_c , F_{ab} , F_{ab}' または $F(ab')_2$ 断片である。(例えばヒューストン (H u s t o n) 外著、細胞生体物理学 2 2 : 1 8 9 - 2 2 4 , 1 9 9 3 ; およびハーロウ (H a r l o w) およびレーン (L a n e) 著「抗体」 (A n t i b o d i e s) : 研究所マニュアル, コールド, スプリング , ハーバー, ラボラトリー (A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y) , 1 9 8 8) 。好ましくは、「機能的断片」は、例えば S E Q I D N O : 1 または 3 のアミノ酸配列の 5 , 1 0 , 1 5 , 2 0 , 1 5 , 3 0 , 5 0 , 7 5 または 1 0 0 連続アミノ酸と実質的に同一のアミノ酸配列をもつ。更に好ましい態様においては、「機能的断片」は S E Q I D N O : 1 または 3 の配列の断片と同一である。この種の「機能な断片」は S E Q I D N O : 1 または 3 の 5 , 1 0 , 1 5 , 2 0 , 1 5 , 3 0 , 5 0 , 7 5 または 1 0 0 連続アミノ酸を含有するか、あるいは S E Q I D N O : 1 または 3 の総てのアミノ酸配列でありうる。

【 0 0 4 5 】

ここで用いた「相補性決定領域」とは、免疫グロブリンの超可変部領域を意味する。この用語は V_L と V_H 領域とは均一に変えられるものではなく、むしろ、それらのアミノ酸の変動の多くは三つの短い超可変領域配列に集中される。それは抗体の特異性について欠くことができない。C D R の同定は B L A S T ソフトウェア (アルトシュル, ステフェン F . (A l t s c h u l , S t e p h e n F .) , トーマス L . マデン (T h o m a s

L. Madden), アレジャンドロ A. シェッフェー (Alejandro A. Schaffer), ジンフイ ツァング (Jinghui Zhang), ツェングツァング (Zheng Zhang), ウェブ ミラー (Webb Miller), 及びダビッド J. リップマン (David J. Lipman) (1997 年著) と、「グループト BLAST 及び PSI-BLAST: タンパク質データベース探索用プログラムの新時代」核酸 Res. 25; 3389-3402. (NCBI データベース)。

【0046】

本発明で用いている「ハイブリドーマ」とは、例えば、活性化されたリンパ球などの正常な細胞とミエローマなどの腫瘍性細胞との融合によって作り出された細胞である。少なくとも 2 種類の細胞の融合によって生じたハイブリッド細胞は免疫学的活性化細胞によって生成したものと同様の単クローン抗体或は T 細胞生成物を生成する。更に、これらの細胞は、腫瘍性の親と同様に不死である。

【0047】

本発明で使用している「細胞増殖抑制」とは、そのタイプの細胞の細胞分裂の正常な速度と比較した細胞分裂の速度の減少を表わす。細胞増殖の抑制は、当該技術における標準である多数の方法、例えば、この明細書に述べた MTT 細胞増殖の分析、BrdU 結合および ³H チミジンアップテイクを利用して分析することができる。この種の分析は、例えば、オースベル (Ausubel) その他の発表による「分子生物学におけるカレントプロトコルス」(Current Protocols in Molecular Biology), ウィリー インターサイエンス, ニューヨーク (Wiley Interscience, New York), 2001; およびサンプルク、その他の発表による「分子クローニング (Molecular Cloning): ア・ラボラトリ マニュアル (A Laboratory Manual), コルドスプリング ハーバー ラボラトリ (Cold Spring Harbor Laboratory), ニューヨーク, 1989 年に記載されている。その望ましい態様にあつては、細胞増殖の抑制は 20%, 40%, 50% または 75% である。更に好ましい態様では、細胞増殖の抑制は、80%, 90%, 95% または細胞増殖の完全なる阻止である。

【0048】

本発明の明細書で記載の「脂質の結合」とは脂質、特に低比重リポタンパク (LDL) および / または oxLDL とポリペプチドとの相互作用のことで、これは腫瘍性細胞の細胞周期を激しく干渉するのである。その干渉は最終的には脂質の蓄積を招く。ポリペプチドが脂質とまず相互作用して複合体を形成し、これが腫瘍性細胞と相互作用するのか、またはポリペプチドが腫瘍性細胞の表面でレセプターと直接に相互作用するのかは不明である。

【0049】

抗体であるポリペプチドは、その単量体で、またはその五量体の形で活性である。

【0050】

ここで述べた「脂質の細胞内蓄積」とは細胞内の脂質濃度の増加、特に、その種の細胞の脂質の通常の濃度に較べて細胞内の脂質、特に低比重リポタンパク (LDL) および / または oxLDL の濃度の増加をいう。LDL は精製ポリペプチドによって培養された細胞中に増加したコレステロールエステルとトリグリセリドをクロマトグラフィー分析することによって形成する細胞内に豊富になった細胞内のコレステロール血症とトリグリセリドをクロマトグラフィー法で分析することによって細胞内に濃縮された脂質であることが判る。専ら LDL だけが、これらの内容を形成する。細胞内脂質蓄積の結果、腫瘍細胞の「リポトーシス (Lipoptosis)」などのアポトーシスに導くのである。

【0051】

細胞内の脂質の蓄積は、次に記載の文献に記載の蛍光染色法のスーダン (Sudan) I II の方法 (グリーンスパン, P.), (Greenspan P.), メイヤー (Mayer), E. P., 及び D. ナイル レッド (Fowler D. Nile Red) の細胞内脂質小滴. J. セル, バイオル (Biol), 100, 965-973, 1985)

に記載されている染色法などを利用して分析し視覚化することができる。

【0052】

この明細書に述べている「アポトーシスの誘導」とは先行文献に明瞭に定義されている細胞の特徴の様相である。(例えば、ウィリー外、ピアール, J. (Wyllie et al., Br. J) 著「癌」80付録1:34-37, 1999;カー(Kerr)外著「癌」26:239-257, 1972)に明記されている細胞の特性の兆候に当てはまる。これらの兆候は、細胞の小気泡, DNA濃縮, F-アクチンの含量変化, ミトコンドリア集合体および細胞膜ポテンシャルの変化を招く。アポトーシスの誘発は、例えば細胞死 ELISA, TUNEL 染色, DNA 染色, 例えば Hoechst 33258 および アクリジンオレンジ, Mito Tracker Red^R 染色液 (Molecular Probes, Eugene, OR), および Annexin V^R 染色法 (ベクトン ディッキンソン, NJ (Becton Dickinson, NJ)) がある。ここで用いている「アポトーシスの誘導」は対照細胞集団と比較した、アポトーシスの変化を受ける細胞の数を増加することを言う。例えば、アポトーシスの増加は10%, 20%, 40%, 50%、または75%とである。好ましい態様においては、アポトーシスの誘導で対照細胞集団に見られるよりも2倍, 3倍, 10倍或は100倍である。

【0053】

本発明で使用されている「腫瘍性の細胞」とは、不適切な条件下で細胞分割中であるか、アポトーシスをしていない、あるいはその両方である細胞をいう。例えば、「腫瘍性細胞」とは、対応する非腫瘍性細胞が細胞分割をしないときに細胞分裂をするものであり、あるいは「腫瘍性細胞」は通常の細胞周期検査制御にตอบสนองしない。

【0054】

ここに於て用いている「増殖性疾患」とは、細胞の異常な増殖に基因する疾患を言う。増殖性の疾患の特例を挙げると数多の腫瘍、例えば肺の腺癌、扁平細胞肺癌、腸型胃癌、びまん性胃癌、結腸の腺癌、前立腺の腺癌、食道の扁平細胞癌、食道の腺癌、胸部の管の癌、膵臓の腺癌、卵巣の腺癌または子宮の腺癌などである。しかし、増殖性疾患は形質転換ウイルスで感染される結果にもよるのである。

【0055】

本発明に於て述べている「タンパク質精製タグ」とは、ペプチド、例えばエピトープタグで、これはタンパク質の精製を促進するために共有的に、または非共有的にタンパク質に添加される。この種のタンパク質が抗体に高度の親和性で結合すること、或はビオチン或はアビジンなどの別種のペプチドに結合することは望ましいことである。エピトープタグに関して市販のものの例を挙げると、His-タグ, HA-タグ, FLAG^R-タグおよびc-Myc-タグがある。しかし、抗体で認められているエピトープもタンパク質精製タグとして使用することができる。例えば、アウスベル(Ausbel)外著、[Molecular Biology (分子生物学)における流動プロトコル(Current Protocols), ニューヨーク, 2001番地 Wiley インターサイエンス社(Wiley Interscience)発行]を参照のこと。タンパク質精製タグは、酵素、例えばトロンビン、或は化学薬品、例えば臭化シアノジェン臭化物を用いてタンパク質から分割することが出来る。

【0056】

ポリペプチド、例えば抗体について用いられる物質について、「特異的に認識」することは、特定のタンパク質、例えば抗原が、それと等量の別種のタンパク質に比較して、その親和力が優れているということである。例えば、BXP C-3 (ATCC 受託番号 CRL-1687), 23132/87 (DSMZ 受託番号 ACC201), COLO-206 F (DSMZ 受託番号 ACC21), COLO-699 (DSMZ 受託番号 ACC196) または LOU-NH91 (DSMZ 受託番号 ACC393)、または BXP C-3 (ATCC 受託番号 CRL-1687) 細胞と特異的に結合する SAM-6 ヒトモノクローナル抗体のような抗体は、好ましくは、関連抗原を含むその他のいかなる等量の抗原に対してよりも、少なくとも2倍, 5倍, 10倍, 30倍または100倍大きい親和性をその抗原

に対してもつ。ポリペプチドが他のポリペプチドと結合することは、ここに述べたことと、技術上の標準的な手段、例えば、ウエスタン (Western) 分析 E L I S A、または免疫沈降などの多くの方法で調べることが出来る。

【 0 0 5 7 】

「実質的に同一」とは、基準となるアミノ酸 (例えば S E Q I D N O : 1 または 3) 或は核酸の配列 (例えば、S E Q I D N O : 2 または 4) にポリペプチドまたは核酸が少くとも 7 5 % , 8 0 % , 8 5 % , または 9 0 % 同一であることを意味する。望ましい態様にあつては、ポリペプチド或は核酸配列が基準となるアミノ酸または核酸配列に少くとも 9 5 % , 9 8 % , 9 9 % 或は 1 0 0 % 同一である。ポリペプチドについては、比較する配列の長さは通常、少くとも 5 , 1 0 または 1 5 アミノ酸で、好ましくは少くとも 2 0 または 2 5 連続アミノ酸である。更に望ましい態様では、比較配列の長さは少くとも 3 0 , 5 0 , 7 5 , 9 0 , 9 5 或は 1 0 0 連続アミノ酸或は全長アミノ酸配列である。核酸については、比較配列の長さは、一般に、少くとも 1 5 , 3 0 または 4 5 連続ヌクレオチドで、好ましくは少くとも 6 0 連続ヌクレオチドである。更に望ましい態様にあつては、比較配列の長さは少くとも 7 5 , 1 5 0 , 2 2 5 , 2 7 0 , 2 8 5 或は 3 0 0 連続ヌクレオチド或は全長ヌクレオチド配列である。

【 0 0 5 8 】

配列 同一性 はデフォルト設定に関する配列分析ソフトウェアを利用して測定する。(例えば、アメリカ合衆国ウィスコンシン州 マディソン, W I 5 3 7 0 5 ユニバーシティアベニュー 1 7 1 0 , ユニバーシティ オブウィスコンシン バイオテクノロジー センター ジェネティクス コンピューターグループ (the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1 7 1 0 University Avenue, Madison, W I 5 3 7 0 5) のセクエンスアナライジーズ ソフトウェア パッケージ (Sequence Analysis Software Package) 。

【 0 0 5 9 】

このソフトウェアは数多の置換, 欠失および他の修飾についてホモロジーの度合を割り当てて類似する配列を合わせることが出来る。保存性の置換は典型的には、次に掲げるグループ内の物から成っている。即ち、グリシン, アラニン, バリン, イソロイシン, ロイシン; アスパラギン酸, グルタミン酸, アスパラギン, グルタミン; セリン, トレオニン; リジン, アルギナー; およびフェニルアラニン, チロシン。

【 0 0 6 0 】

多数の配列は、これをドイツのヨーロッパ分子生物研究所 (European Molecular Biology Laboratory) とイギリス, ケンブリッジのヨーロッパ無機生物学研究所 (European Bioinformatics Institute) のジュリー D . トンプソン (Julie D Thompson) とトビーギブソン (Toby Gibson) とデズモンドヒギンズ (Desmond Higgins) によって作成されたクラスタル (Clustal) W (1 . 4) プログラムで、ペア式整列モード (pairwise alignment mode) を「スロー (slow)」に設定し、1 0 . 0 の開放ギャップペナルティ (open gap penalty) 0 . 1 を含む対をなす整列モードを設定し、「ブローサム」 (blosum) と類似するマトリックスを設定する。更に、多重アライメントパラメータが 1 0 . 0 の開放ギャップペナルティ (open gap penalty) 、0 . 1 の延長ギャップ ペナルティ (extend gap penalty) を含むことが出来、同様に類似するマトリックスを「ブローサム」 (blosum) , 4 0 % , 分岐, 間隙距離 8 に設定する。

【 0 0 6 1 】

「精製した」または「単離した」とは、自然に随伴している別の成分から分離する意味である。一般的に、ある要素は、これが天然に関連しているタンパク質、抗体および天然有機分子を重量で少くとも 5 0 % 含まないとき、あるいは核酸分子に関しては核酸分子の配列と隣接する核酸配列を少なくとも 5 0 % 含まないときには実質的に純粋である。好まし

くは前記要素因子は少くとも、重量で75%、更に好ましくは少くとも、重量で90%、より好ましくは重量で少くとも99%、純粋である。実質的に純粋な要素は化学的合成、天然資源から要素の分離、または要素を自然には生成しない組換え宿主細胞から製造する。タンパク質、小胞および細胞小器官は標準とする技術、例えばオースベル (Ausbel) 外の記載の技術 (カレントプロトコルス イン モレキュラ バイオロジー (Current Protocols in Molecular Biology), ウィレイ インターサイエンス社 (Wiley Interscience), ニューヨーク, 2001 発行を参照。その因子は出発物質が純粋な場合には、少なくとも2.5あるいは10倍で、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法, カラムクロマトグラフィー, 光学不透明度, HPLC 分析, またはウエスタン (Western) 分析 (オーサベル氏他著「分子生物学」, ニューヨーク, 2001) (Ausubee et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001) を利用して測定する。精製の望ましい方法は、免疫沈降, コラムクロマトグラフィー, つまり免疫沈降クロマトグラフィーと、ニッケルアフィニティカラム, 磁気数珠状免疫清浄化, 及びプレート・バウンド抗体によるパンニングである。

【0062】

図面の簡単な説明

図1は腫瘍組織に関する抗体SAM-6による免疫組織化学による染色を示す。SAM-6抗体パラフィン切片2(μm)の特異性を調べるために濃度4μg/mlの濃度で抗体SAM-6と類似する濃度の同一基準標本で関連の無いヒトを対照とする調査をした。形態学的な分析のために、一つのサンプルをヘマトキシリン/エオシン(H&E)で更に着色した。図1の個々の画像は、Aが乳房の侵襲性の癌; Bは結腸の腺癌、Cは食道の扁平細胞腺癌(最初の倍率×200)。図1の映像は抗体SAM-6が腫瘍細胞だけに反応しているが、悪性腫瘍の領域は着色されていない。

【0063】

図2は正常な組織に抗体SAM-6をもって染色した免疫組織化学を示す。パラフィン切片(2μm)は濃度4μg/mlで抗体SAM-6に培養されている。形態学的に試料を分析するために、ヘマトキシリン/エオシン(H&E)で着色した。試料を図2に示す。それぞれの映像; A, 肺; B, 子宮; C, 結腸; D, 睪丸(最初の倍率×200)である。健康な組織を染色していないために、SAM-6は悪性の組織に特に明示したレセプターに結合してある。

【0064】

図3はウエスタンプロット分析, アポトーシス検定および形態学的分析によって、SAM-6抗体の特異性と機能的な分析を示す。図3のそれぞれの図、Aは胃の癌腫ライン23132/87と膵臓癌腫ラインBXP C-3とがニトロセルロースにプロットしてあり抗体SAM-6で染色されている。Bは抗体SAM-6のアポトーシスの活動度が細胞死亡診断検出ELISA^{PLU}によって調べられている。胃癌細胞ライン23132/87, 膵臓癌細胞ラインBXP C-3, 鼻の隔膜細胞癌ラインRPMI-2650と正常の鼻の上皮の細胞(HNEpC-C)とが抗体SAM-6と48時間4μg/mlの濃縮の複基準制御とによって培養されている。アポトーシス細胞の量は415nmにおけるフォトスペクトロメトリー415nmで、基準波長490nmで決定される。Cは腫瘍細胞形態学の抗体誘導変化である。図3Aによれば、SAM-6は約140KDaの分子量で膜分子に結合している。図3BのプロットはSAM-6が3種類のテストした癌細胞体型、つまり胃, 膵臓および鼻の中隔癌細胞のアポトーシスを誘発することを示すもので、正規の鼻の中隔上皮細胞におけるものではない。図3Cにおいては、抗体SAM-6誘導アポトーシスの形態学的の変化が胃癌および膵臓癌細胞に示されている。未処理の腫瘍細胞は同種の単一層において成長する。抗体SAM-6で処理した後、細胞は更に細長くなり、平坦になり、極めて顕著な細胞部の伸長部で更に分裂される。細胞の喪失、細胞の接触および付着は48時間後に、はっきりと観察される。(細胞の数の減少は癒着による喪失の結

果として溶液中に入り込んだ細胞に起因する。)

【0065】

図4は電子顕微鏡を走査してSAM-6抗体誘導アポトーシスの細胞の映像を示す。この技術によって細胞の形態学的で細菌外アポトーシスの効果を研究する。検査のために、胃癌細胞ライン23132/87を抗体SAM-6または濃度10 μ m/mlにて適応する時間をかけて培養した。その試料を電子顕微鏡で走査し、相違する時間をかけてZEISS DSM962によって分析した。図4に示すそれぞれの映像A, B, Cは複基準制御抗体を示し、D, E, FはSAM-6抗体、横棒は20 μ m、倍率は $\times 3800$ 、横棒は20 μ mを示す。G, H, IはSAM-6細胞消滅効果を示し、Gはストレス線維 $\times 7000$ 、横棒は10 μ mを示す。図4Hは神経核の腫脹、 $\times 20000$ 、横棒は2 μ mを示す。Iはアポプトニック体(apoptonic body)、 $\times 40000$ 、横棒は μ mを示す。図4に示すように、2時間後にSAM-6処理された最初の形態学的な変化はストレス線維の形成物を含んでいる(図4D, E)、そして細胞-細胞接触の僅かな減力となっている。24時間後に形態学的な変化を観測した。細胞-細胞接触は無限に低い(図4E)、細胞は拡大されるか凝縮され、細胞核は膨張されている(図4H)、そして細胞の自死が増加している。最も劇的な効果は48時間後に判った。多くの構造のプラズマ膜の変化がアポトーシスの細胞に見受けられた。細胞粘着の喪失、膜分節の平滑化、縮小および外方袋状化が細胞損傷および細胞死に関連したマーカーとして認められた。萎縮腫瘍細胞、膜小胞の巨大なパッケージ、細胞消滅体に関する最も重要な点が密集している(図4F)。(高倍率で示してある平滑面アポトーシスの本体は食細胞崩壊の生体内における再循環と対照し、死亡した細胞に残存する生体内における小胞を示す。)

【0066】

図5は電子顕微鏡(TEM)装置に透過した結果を示す。細胞内のアポトーシスの作用を探索するために、胃癌細胞に関してSAM-6をもって電子顕微鏡による検討を行った。24時間後、細胞に激しい変化と、細胞内の原形質の形を観察した(図5E)。細胞は拡大され、この段階では、細胞の容量は減少されていなかった。細胞は紡錘状になり、極めて顕著に細胞質が伸長して大きく分極された。細胞核の大きさが増加し、その表面は滑らかで、特有の不規則性を失い、調節することによって切り込みのある形に見えた。更に重要なことは、24時間後に、細胞質中に脂質小胞の劇的な蓄積がはっきりと見えるようになった(図5E)。調査中の腫瘍細胞の殆んどに、それぞれの細胞核の近くに脂肪酸の堆積が見受けられた。48時間後に、SAM-6処理をした細胞は細胞自死の最終段階に達した(図5F)。最も重要な構造変化は細胞と細胞との接触の消失、細胞の縮小、細胞核の激しい凝縮とプラズマと細胞核膜の退化とである。腫瘍細胞中に蓄積された脂質小胞の集合体は極めて拡大して示してある(図5G)。そして細胞核の退化は(図5H)に、2種の腫瘍細胞の細胞表面からの細胞自死体の形態は(図5I)に示してある。

【0067】

図6はスダンIII染色実験の結果を示す。抗体誘導脂質蓄積を検査するために、スダンIIIによる染色を行った。この染色は中性の脂質と脂肪酸の検出のために独得のものである。図6は胃癌の細胞と膵臓癌細胞に関する培養の48時間後に得たデータを示すもので、抗体SAM-6についてと、関連することのないヒト対照IgMとについて示す。胃癌細胞ライン23132/87は抗体SAM-6で処理した時の中性の脂質の抗体誘導蓄積をはっきりと示している(図6A)。無関係なヒト対照IgMで処理した細胞は前と類似の細胞内の変化を提示していない。膵臓癌細胞ラインBXP-3でも同じ結果が観察された(図6B)。

【0068】

図7はナイル赤染色実験の結果を示す。細胞の脂質もまた蛍光染料ナイル赤で染色することによって視覚化することができる。ここにおいて、特定の波長(26, 27)で調べたとき、無極或は中性脂質染料黄金および有極脂質染色ダークレッドであった。胃癌細胞(23132/87)を抗体SAM-6で48時間培養して脂質の蓄積を研究した。蛍光は中性脂質について488nmにて測定され、極性脂質について543nmにて測定された

。図 7 A と D とは無極の中性脂質に関する黄色の染色を示し、図 7 B と E とは極性脂質に関する赤色の染色を示し、図 7 C と F とは両方の重畳を示す。予期した通り、SAM-6 処理細胞の中性脂質に関する強度の黄色蛍光染色は 48 時間後に見ることが出来る (図 7 D)。多量の膜タンパクを示す対照 (図 7 B) に比較して極脂質について染色された SAM-6 処理細胞に関して増加が見受けられる (図 7 E)。抗体 SAM-6 は アポトーシス を増加するので、多量の極脂質が更に多くの膜小胞の形成を招く。即ち、細胞の自滅体を招くのである。図 7 C と F に見られるように、極の脂質は赤色を呈し、明瞭でない脂質は黄色と若干がオレンジ色を呈すると思われる。ナイル赤の赤色蛍光性は極めて激しく、黄金色蛍光測定になる可能性があり、明確な差別が中性のものと極性脂質染色との間にされることが出来る。これらの結果をすべて取り上げ、更に SAM-6 抗体が癌細胞に中性脂質の滞留を招くものである。

【0069】

図 8 A は oxLDL の量が CuSO_4 を LDL の培養により増加していることを示す。しかし LDL が CuSO_4 で培養されなくても、その酸化した形 (oxLDL) で LDL が可成り多量であることを示している。

【0070】

図 8 B は oxLDL が SAM-6 抗体の好ましい結合相手であることを示す。15 時間 CuSO_4 で培養されたサンプルは 3 時間で培養したサンプルよりも多量の SAM-6 抗体が結合している。同基準標本として、ヒトとは関係のない IgM (クロンプア IgM ディアノヴァ) (Chrompure IgM, Dianova) を用いた。

【0071】

図 9 a は薄層クロマトグラフィーで分析した培養された細胞の脂質の組成を示す。左側における最初の列と右側の最後の列とは異なる分子量のものが載せてある。第二列目と第三列目とは SAM-6 抗体で培養する細胞の脂質組成を示す。対照抗体で培養した細胞と比較して、SAM-6 抗体で処理した細胞はトリグリセリドとコレステロールエステルとのような極めて高分子量の脂質を含有することを示した。

【0072】

図 9 b は図 9 a に示した実験の高分子量の脂質を薄層クロマトグラフィーによって更に分析された結果を示す。左側の最初の列と右側の最終列とは異なる分子量の基準のものである。二列目と三列目とは SAM-6 抗体で培養した細胞の脂質組成を示す。SAM-6 抗体で処理した細胞を対照抗体で培養した細胞に比較すると余分にコレステロールとトリグリセリドとを含有している。

【0073】

図 10 A と 10 B とは SAM-6 抗体または対照抗体で処理された腫瘍接種マウスを用いての生体内での実験の結果を示す。図 10 A によると、SAM-6 で処理したマウスの腫瘍の平均重量は 96.2 グラムであり、対照抗体で処理したマウスの腫瘍の平均重量は 150.5 グラムであった。図 10 B は腫瘍の重量に該当する腫瘍の容積の分析を示す。SAM-6 で処理したマウスの腫瘍の平均容積は 126.3 mm^3 で、これに対して対照抗体で処理したマウスの腫瘍の平均容積は 158.2 mm^3 である。

【0074】

配列表

配列表にはアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 1) (1) とヒト単クローン性の抗体 SAM-6 の短鎖 (V_L) の可変領域の核酸配列 (SEQ ID NO: 2) (2) とを示す。

【0075】

配列表 3 と 4 とはアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 3) (3) と、ヒト単クローン抗体 SAM-6 の長鎖 (V_H) の可変領域の核酸配列 (SEQ ID NO: 4) (4) とである。

【0076】

詳細な説明

本発明は抗体などのポリペプチド類と、腫瘍の治療と診断とにそれらを使用することを特

徴とするものである。本発明者らは、特に数多の腫瘍を特異的に認識するヒト単クローン性の抗体（SAM-6）を特徴づけた。この単クローン性の抗体は、これら腫瘍を認識するだけでなく、細胞に結合したときに腫瘍性の細胞のアポトーシスを誘導し、これら細胞の増殖を阻止し、また、これら両者の作用をするのである。更に、抗体（SAM-6）はアポトーシスの誘導および/または細胞増殖の抑制の原因となるか、またはこれをサポートする脂質の細胞内の蓄積をも誘導するのである。したがって、SAM-6単クローン性の抗体或はその断片は、これらポリペプチドによって認識される抗原に特異的であり、腫瘍を診断し、治療するための各種の方法に利用することが出来る。

【0077】

抗体とポリペプチド

抗体は個人の健康の維持に不可欠な役目を果すものである。特に、抗体は血清中に存在し、バクテリア、ウイルスおよび毒素などの種々の病原体を除去する助けをするものである。抗体は2本の重鎖2本の軽鎖とから成るY字形タンパク質構造から成っている。各鎖はモジュラ構造を備えている。即ち、軽鎖は2つのドメインから成っていて、各々の重鎖は少なくとも4つのドメインから成っている。抗原結合部位は重鎖からの1つのドメイン（V_Hドメイン）と軽鎖からの1つのドメイン（V_Lドメイン）によって形成されている。確かに、小さい抗原結合フラグメントはこれら2つのドメインを、非共有結合的に結合するか、或はジスルフィド結合またはペプチド結合による共有結合によって製造する。抗原結合ドメインは、抗体の他のドメインよりもアミノ酸配列において可変性であり、それ故に、定常（C）ドメインに対して可変（V）ドメインと名付けられている。抗体の定常ドメインは、抗体エフェクタ機構、即ち補体の崩壊および細胞媒介殺害などを誘発する。

【0078】

抗体は遺伝子再配列を含む方法でB-リンパ球によって造られる。これらの細胞の発生の間に、可変領域をコード化する遺伝子が遺伝子要素から組立てられる。V_Hドメインの場合には、3つの成分、つまり再配列されていないV_H遺伝子、Dセグメント及びJ_Hセグメントである。V_Lドメインの場合には、2つの成分、つまり再配列されていないV_L（VラムダまたはVカッパ）遺伝子とJ_L（JラムダまたはJカッパ）区域である。これらの遺伝子の区域の不規則な組み合わせと、再配列したV_HとV_Lドメインの不規則な組み合わせとで、同様に種々の性質を持つ抗原に結合することが出来る。

【0079】

一般に、本発明のポリペプチドはBXP C-3, 23132/87, COLO-206F, COL D-699およびLOU-NH91に結合するが、非腫瘍性の細胞には結合しない、あらゆる薬剤である。ポリペプチドはヒト-モノクローナル抗体（例えば、SAM-6）、或はその機能的断片などの抗体でも差支えない。全体的に見て、本発明のポリペプチドは腫瘍性の組織と腫瘍性の細胞との両者に排他的に結合することが出来るのであるが非腫瘍性の組織または細胞には結合しない。ポリペプチドはまた、これが結合する腫瘍性の細胞の増殖を抑止することが出来るが、非腫瘍性の細胞の増殖を抑えることは無い。好ましくは、ポリペプチドは細胞のアポトーシス誘導と腫瘍性細胞の増殖抑制とを同時に誘起することが出来るけれども、非腫瘍性の細胞では、以上のようにすることは出来ない。それゆえ、ポリペプチドは哺乳動物の癌の検出、観察、および治療に極めて有用である。本発明の方法で取扱われている癌は、結腸直腸の癌、卵巣の癌、扁平細胞肺癌腫、小細胞肺癌腫、小房および管の乳癌、黒色腫、乳癌、肺癌、例えば肺腺癌、胃癌、膵臓癌、例えば膵臓腺癌、グリオーマ、ブドウ状肉腫、胃腸管系の癌、脳腫瘍、食道癌、例えば食道扁平細胞癌腫、胃癌、骨肉腫、線維肉腫、膀胱癌、前立腺癌、例えば摂護腺癌、腎臓癌、卵巣癌、睾丸の癌、子宮内膜の癌、頸部の癌、子宮の腺癌、ホジキン病（リンパ肉芽腫）、リンパ腫、および皮膚白血病である。これらのポリペプチドは肺の腺癌、扁平細胞肺癌腫、腸管型胃癌、散在型胃癌、結腸の腺癌、前立腺の腺癌、食道の扁平細胞癌腫、食道の腺癌、胸の小葉癌、胸の腺癌、膵臓の腺癌、卵巣の腺癌、または子宮の腺癌には特に効果がある。

【0080】

製造法

本発明に基づくポリペプチドは、小規模で、また大規模で、或はポリペプチドの市販の製造法で製造することが出来る。例えば、モノクローナル抗体、例えばSAM-6は、ハイブリドーマ細胞ラインで製造出来る。この種の細胞ラインは腫瘍、例えば胃癌、結腸癌腫または膵臓癌腫などにかかっている患者由来の脾臓リンパ球またはリンパ結節リンパ球とヘテロミエローマ細胞株との融合によって生じたものである。ヘテロミエローマ細胞株の例としては、例えば、HAB-1（ボルマー（Volkmers）外、「癌」74：1525-1532頁，1994），CB-F7（デルビグ（Delvig）外、Hum.抗体ハイブリドーマ6：42-46，1995），K6H6B5（デルビグ外，Hum.抗体ハイブリドーマ6：42-46，1995），H7NS，934（デルビグ外，Hum.抗体ハイブリドーマ6：42-46，1995），SHM-D33（ブロン（Bron）外、Proc.Natl.Acad.Sci.USA81：3214-3217，1984），およびB6B11（ポリソバ（Borisova）外，Vopr.Virusol，44：172-174，1999）を含む。癌患者のリンパ球由来のヒトモノクローナル抗体が生成できると、その癌患者の腫瘍に対する免疫反応によって生成される抗体の単離が可能となる。

【0081】

一般的に、リンパ節或は脾臓の部分は、結腸癌腫や膵臓の癌腫などの癌を有する患者から手術によって除かれる。リンパ球は機械的な手段によって細胞懸濁液として調製され、次で、例えば細胞融合を招く条件のもとでヘテロミエローマ細胞株と、例えば1：2または1：3の割合で融合される。例えば、ヘテロミエローマ細胞株HAB-1はヒトリンパ球とマウスミエローマNS-0を融合して得られるが、この目的のために使用できる。

【0082】

癌患者から得られたリンパ球とヘテロミエローマ細胞株との融合に続き、ハイブリドーマまたはトリオマ（trioma）を生成する抗体が発生される。一度構成されると、ハイブリドーマは通常安定して生長し、抗体の発生が順調で、数ヵ月間に多量の培養物が（フラスコや、ミニバーム（miniperm）や、発酵槽など）に安定して生長する。フラスコ内での抗体の生成は0.01-0.1mg/mLの範囲で、ミニバーム内では0.1-0.5mg/mLの範囲である。細胞融合は周知技術で行うことが出来、例えば40%ポリエチレングリコールを使用する方法も含まれている。ハイブリドーマもHAT（ハイポベンシン-アミノプテリン-チミジン）（Hypovanthin-aminopterin-thymidin）を含有する培地で培養することが出来、上澄みはELISA効力検定を利用して抗体の生産物を分離することが出来る。次で、陽性のクローンをアタッチメント抑制で試験し、一般に入手することの出来る腫瘍細胞株を用いて試験する。陽性のクローンを、更に腫瘍と正常な組織との免疫ペルオキシターゼを使用して試験した。このようにしてクローンを自家移植と同種異系の腫瘍性の細胞とで、その反応性を基礎として選択することが出来る。抗体は陽イオン交換、疎水性の相互作用、大きさの選択、或は親和力クロマトグラフィーなどの方法と、更にこれら方法を組み合わせた方法、例えばボルマー氏（Volkmers）外により（腫瘍学レポート）（Oncology Reports）（5：35-40，1998）に記載されている方法で、集団培養物から精製することが出来る。抗体の生産の後で、トリオマ（trioma）によって造った抗体の付加的な機能と免疫組織化学の試験を行った。例えば、ハイブリドーマによって作製した抗体について、アポトーシスを誘導する性能と、細胞の増殖を抑制する性能とを、またそれら両方の性能を、何等の処理を行った細胞と比較してテストすることが出来る。また、抗体は非腫瘍性細胞と比較して腫瘍性細胞の系統BXP-3，23132/87，COLO-206F，COLO-699またはLOU-NH91などとの特別な結合についての能力について試験することも出来る。

【0083】

また、その代りに、抗体を含むポリペプチド或はその断片を、大腸菌またはイースト、例えば、S.セレビシアエ（cerevisiae）などの宿主細胞中でポリペプチド或は

抗体を発現させることによって造ることが出来る。例えば、本発明の抗体は次に述べるように同定することが出来る。抗体もしくはその断片は、凡そ 10^7 或はそれ以上の抗体のライブラリ (library) を生成する線維状のバクテリオファージに挿入される。各ファージはそれに包含されている核酸によってコードされるその表面上の抗体を発現する。このようにして、本発明の抗体はこの明細書中に記載されている機能および組織化学的効力検定によって調査され、検出され、その遺伝子は、その後において、選択され、大腸菌中で発現される。このシステムは、例えば米国特許第 5, 876, 691 号に示されている。

【0084】

抗体または抗体の破片もまた、例えば、組換え方法を利用して直接に合成して発生させることが出来る。これらの方法は技術上、基本的な手段である。例えば、核酸配列をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を利用して増幅することが出来る。PCR に関する技術は技術上公知であって、米国特許第 4, 683, 195 号に開示されている。標準的な前記の方法を用いれば、ハイブリドーマによって発現されたモノクローナル抗体の配列が得られ、抗体の機能的な断片を増幅することが出来る。例えば、全 RNA を腫瘍特異的単クローン性の抗体を発現するハイブリドーマから分離することが出来る。次で cDNA が逆転写酵素を用いて RNA から生成され、重鎖と軽鎖との可変領域の機能的な断片を含有する cDNA を PCR を用いて増幅する。PCR 生成物は次で精製され、発現ベクター、例えばプラスミドまたはウイルス性のベクターにクローン化される。多くの標準ベクターを利用することが出来、適切なベクターの選択は、例えば、ベクターに挿入する DNA のサイズとベクターで形質転換される宿主細胞による。

【0085】

ポリペプチド、例えば SAM - 06 抗体などのアミノ酸配列変異体は、抗体をコードする DNA に適切なヌクレオチド変化を導入したり、或は所望のポリペプチドの生体外での合成によって製造することが出来る。この種の変異体には、例えば、SAM - 6 抗体のアミノ酸配列内における残基の欠失または付加或は置換を含む。最終構成物が所望の特徴、例えば腫瘍性の細胞のアポトーシスを誘導するが、非腫瘍性細胞では誘導しない、または腫瘍性細胞の増殖を抑制するが、非腫瘍性の細胞では抑制しないといった特徴を有する限り、あらゆる欠失、付加、および置換の組み合わせを用いて最終構造に達するようにすることが出来る。また、アミノ酸の変化が抗体の翻訳後プロセッシング、例えばグリコシル化部位の数または位置を変えること、膜の固着特性の変更、またはタンパク質分解の分裂に対するその感受性の変更などにおける変化をもたらす。

【0086】

抗体のようなポリペプチドのアミノ酸配列を変更しようとするには、変位部位の位置と変異の性質とは変更されるべき特質に依存する。変異の部位は個別的に、または連続的に、例えば、最初に保存性アミノ酸で選択し、次で前記で得た結果によりさらに過激な選択で、またはターゲット残基を削除することによって行う。

【0087】

ポリペプチドの突然変異生成についての特別の残基または部位を同定するための有用な方法を「アラニン走査突然変位誘発」と言って、例えばカンニングハム (Cunningham) 氏とウエルズ (Wells) 氏著 (サイエンス 244: 1081 - 1085 頁, 1989) に記載されている。ここで、ターゲット残基の残基或はグループ (例えば、arg, asp, his, lys 及び glu などの帯電した残基) が確認され、そして細胞内部或は細胞外部の周囲の水溶性の環境によってアミノ酸の相互作用に影響して中性もしくは陰電気を帯電したアミノ酸 (最も望ましくはアラニンまたはポリアラニン) に取って代った。次で、置換に対して機能的な感度を示すドメインが置換の場所において、或は置換の部位に関して導入されて精製された。このようにして、アミノ酸配列の変化を導く位置が前以て決定されるが、突然変位の性質は前もって決定される必要はない。例えば、特定の場所における変異の実効性を最適化するために、アラニンスキャニングまたはランダム突然変異誘発がターゲットコドン或は置換領域において行なわれ、発現された変異体が、

例えば、腫瘍性の細胞のアポトーシスを誘導する能力があるが、非腫瘍性の細胞では誘導しない、あるいは腫瘍性細胞の増殖を抑制するが、非腫瘍性細胞の増殖は抑制しないなどの能力につきスクリーニングする。

【0088】

置換的突然変異生成について頗る興味のある部位はポリペプチドの生物学的活性に影響するのに役立つ部位を含んでいる。これらの部位は、少くとも三つの同様に保存された部位の配列に属し、比較的保存性に富んでいる。例えば、翼状部はval, leuまたはlieで置換することができ、argはlys, glnまたはasnで置換されることができ、aspはgluで代えることができ、cysはserで置換でき、glnはasnで代えることができ、gluはaspで代替えでき、glyはproで、hisはasn, gln, lysまたはargで代えることができる。ileはleu, val, met, ala、またはpheで置換されることができ、leuはile, val, met, ala、またはpheで置換されることができ、lysはarg, gln、またはasnで置換されることができ、metはleu, phe、またはileで置換されることができ、pheはleu, val, ileまたはalaで置換されることができ、proはglyで置換されることができ、serはthrで置換されることができ、thrはserで置換されることができ、trpはtyrで置換されることができ、thrはserで置換されることができ、trpはtyrで置換されることができ、tyrはtrp, phe, thr、またはserで置換されることができ、valはile, leu, metまたはpheで置換されることが出来る。

【0089】

抗体と検出可能物質とのコンジュゲーション

必要に応じて、抗体（例えば、SAM-6などのモノクローナル抗体）、またはその断片を検出可能物質に連結して、ポリペプチドの精製を可能にし、また必要とする哺乳動物における腫瘍の診断、モニタリングまたは治療に用いることができる。適切な検出可能物質お選択は、ポリペプチドの意図的な使用に依存し、当業者にとっては明瞭であろう。本発明により検出可能物質は、例えば、タンパク精製タグ、細胞毒素、酵素、常磁性のラベル、酵素基質、補足因子、酵素反応抑制剤、染料、放射性核種、化学ルミネセント標識、蛍光マーカー、成長阻害剤およびビオチンである。

【0090】

タンパク精製タグはポリペプチドの分離を促進するために、本発明のポリペプチドに共役させることが出来る。タグの例としては、His-タグ、HA-タグ、FLAG[®]-タグ、及びC-MyC-タグを使用することが出来る。酵素の或は化学開裂部位はポリペプチドとタグの一部分との間で処理されるので、タグは精製によって除去することが出来る。適当な毒素とはジフテリアの毒素、プセウドモナス外毒素A、リシンおよびコレラの毒素のことである。適当な酵素タグを挙げると、リンゴ酸塩ヒドロゲナーゼ、ブドウ状球菌ヌクレアーゼ、デルタ-5-ステロイドイソメラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、アルファグリセロールリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸塩イソメラーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸塩デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼがある。適当とするラジオアイソトープのラベルには、³H, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³²P, ³⁵Sおよび¹⁴Cがある。好ましくは、ラジオアイソトープは10-5, 000KeV範囲、より望ましくは100-500KeVを放出する。常磁性のアイソトープもポリペプチドに接合することができて、癌の診断と治療とに生体に使用される。この種の共役抗体を使用することは生体に関して核磁気共鳴イメージングをする。このような方法は既に記載されている。（例えば、シーファ（Schaefer）氏外著、JACC14:472-480ページ、1989年発行；シャープ（Shreve）氏外著、雑誌、レソン（Reson）Med.3:336-340ページ、1986年発行；ウォルフ、フィシオル（Wolf, Physiol）著、Phys.Med.NMR16:93-95頁、1984年刊；ウェスベイ（

Wesbey) 氏外著, Physiol, Chem. Phys. Med. NMR 16: 145 - 155 頁, 1984 年刊、およびラング (Runge) 氏外著, Invest. Radiol. 19: 408 - 415 頁, 1984 年刊)。代るべきものとして、放射性同位元素を使って識別した抗体も、結合しているタグ付き抗体を組織の外科的な除去を要する放射免疫誘導手術に用いることも出来る。このようにして、識別した抗体を非腫瘍性の組織と区別することによって、腫瘍性細胞の方へと手術を進める。腫瘍イメージングは望ましい一時的な放射性同位元素である。半減期が 1 時間乃至 11.4 日間の種々の放射性のある金属が、スカンジウム - 47 (3.4 日間), ガリウム - 67 (2.8 日間), ガリウム - 68 (68 分間), テクネチウム - 99m (6 時間), インジウム - 111 (3.2 日間) およびラジウム - 223 (11.4 日間) などの抗体類に共役するために利用することが出来る。そのガリウム - 67, テクネチウム - 99m およびインジウム - 111 はガンマカメラ映像化のために好ましく、ガリウム - 68 は陽電子放出断層撮影のために望ましく、ガリウム - 68 は陽電子放出断層撮影のために好ましく、スカンジウム - 47 とラジウム - 223 (およびその他のアルファ放出放射性核種) は腫瘍の治療について好ましいものである。

【0091】

適切な蛍光マーカーの例を挙げると、フルオレスセイン, イソチオシレート, ローダミン, フィコエリトリン, フィコシアニン, アロフィコシアニン, オブサルデヒド及びフルオレスカミンがある。化学ルミセンスマーカーにはルミナルラベル, イソルミナルラベル, 芳香性アクリジニウムエステルラベル, イミダゾールラベル, アクリジニウム塩ラベル, 蔞酸エステルラベル, イソルミナルラベル, 芳香族アクリジニウムエステルラベル, イミダゾールラベル, アクリジニウム塩ラベル, シュウ酸エステルラベル, ルシフェリンラベル, ルシフェラーゼラベルおよびエクオリンラベルがある。当業者は、その他の適切なラベルを承知しており、本発明に応じて使用することが可能である。単クローン性の、或はその断片などの、本発明によるポリペプチドについて検知することが出来る結合は単クローン性の抗体、またはその断片を当業者が周知の規準となる技術を利用して達成することが出来る。基準となる抗体共役技術はケネディ (Kennedy) 氏外著 (クリン・チム・アクタ (Clin Chim Acta) 70, 1 - 31 頁, 1976 年) およびシューアス (Schurs) 氏外著 (クリン・チム・アクタ (Clin Chim Acta) 81, 1 - 40 頁 1977 年) に記載されており、例えば、グルタルアルデヒド法, 過ヨウ素酸塩法, ジマレイミド法, m - マレイミドベンジル - N - ヒドロキシ - コハク酸イミドエステル法がある。抗体は当業者が周知の数多の技術の何等か、例えば米国特許第 4, 444, 744 号を利用して識別することが出来る。これらの方法の総ては、この明細書に掲載した文献に示されている。

【0092】

本発明においては、同一または異なる腫瘍または腫瘍細胞 タイプと関連する異なる抗原または同じ抗原の異なるエピトープに特異的な、異なるまたは同じ標識をされたポリペプチドの混合物を使用することが出来ることが理解されるであろう。このような組み合わせは、特定の場合において、検出, 局所限定および / または治療効果を高めることができ、また一種の腫瘍或は腫瘍の種類より以上に広範囲な検査範囲に広げることが出来る。

【0093】

抗癌剤にコンジュゲートされたポリペプチド

本発明のポリペプチドは腫瘍性細胞のアポトーシスの誘導, 腫瘍性細胞の細胞増殖の抑制、或はその両者を行うが、ポリペプチドはさらに腫瘍性の細胞を殺す薬剤またはその増殖を阻止する物質にコンジュゲートすることもできる。抗体または抗体の断片などのポリペプチドのターゲッティングは腫瘍の破壊を高めるために腫瘍に対して細胞に有毒な、或は抗増殖性物質の導出を招く。それゆえ、ポリペプチドは哺乳類、特にヒトの患者の癌の処理や予防に用いることが出来る。ポリペプチドに関連する細胞毒性物質はポリペプチドが結合している腫瘍細胞または腫瘍を破壊または損傷する。この種の物質の例としては、化学療法薬剤或はラジオアイソトープ, プロドラッグを活性化する酵素またはサイトカイン

を含む。

【 0 0 9 4 】

適切な化学療法薬剤は当業者にとって周知のものであって、例えばタキソール、ミトラマイシン、デオキシコーホルミシン、マイトマイシン - C、L - アスパラギナーゼ、インターフェロン類（特に IFN - アルファ）、エトボシド、テニボシド、アントラサイクリン類（例えば、ダウノマイシン及びドキシソルピシン）、メトトレキサート、ビンデシン、新カルジノステイン、シスプラチン、クロラムブチル、サイトシン、アラビノシド、5 - フッ化リジン、メルファラン、リシンおよびカリチエアマイシン）。化学療法の薬品は当業者にとって周知の方法を利用して抗体に配合することが出来る。

【 0 0 9 5 】

細胞毒性物質として用いるのに適切な放射性同位体は、当業者には周知で、例えば I または ^{212}At などのアスタチンがある。これらの同位体はポリペプチドに付加されることができ、当業者が周知の通常の技術を利用して共有結合させたり、あるいは非共有結合させることができる。

【 0 0 9 6 】

あるいは、細胞毒性物質はプロドラッグを活性化する酵素であってもよい。これは不活性のプロドラッグを腫瘍部位において細胞毒性型に変え、「抗体指向性酵素プロドラッグ療法」(ADEPT)と呼ばれる。このようにして、ポリペプチド酵素配合体は受療者に対して投薬することができ、治療をすべき腫瘍の領域に局在化されることが出来る。次で、プロドラッグは患者に投薬されて、細胞毒性薬剤となって腫瘍の部位に定位して、局在性の酵素の影響を受けて治療するようになる。例示的な酵素は細菌性のカルボキシペプチダーゼ G2 (CPG2) であって、その用途は、例えば WO 88 / 07378 号に記載されている。ポリペプチド酵素配合体は、希望であれば WO 89 / 00427 号の述べるところに従って、腫瘍の近辺でない体の部分の酵素を不活性化する。

【 0 0 9 7 】

別の代案として、本発明のポリペプチドに接合されている細胞毒性物質はインターロイキン - 2 (IL - 2)、インターロイキン - 4 (IL - 4)、或は腫瘍ネクロシス・ファクターアルファ (TNF - α) などのサイトカインとすることが出来る。ポリペプチドは腫瘍に対するサイトカインを標的とするので、サイトカインは他の組織に何等の影響を及ぼすことなく、腫瘍を損傷し、或は破壊する。サイトカインは通常の組換え型 DNA 技術を利用して DNA 準位でポリペプチドに融解する。

【 0 0 9 8 】

更に、例えばゲニステイン、タモキシフェン或はシクロホスアミドなどの細胞増殖の抑制物質を、本発明のポリペプチドで共役することが出来る。

【 0 0 9 9 】

用量

本発明の治療法について、患者に対する本発明のポリペプチドの投与はその投与に対する特定の様式、用量または投与間隔の頻度に限定する意図はない。即ち、本発明は筋肉内、静脈内、腹腔内、脈管内、関節内、病巣内、皮下或は腫瘍細胞の増殖を抑制することにより腫瘍性の細胞のアポトーシスによって腫瘍性細胞の数を減少させるのに適当とする投与量であれば、どのような経路をとっても問題とすることはない。これらの複合体は患者に対して 1 回量または多数の用量を投与する。多数の用量を投与する場合には、その投与を、例えば、1 日、2 日、1 週間、2 週間或は 1 ヶ月などのいずれかに分ける。例えば、ポリペプチド（例えば SAM - 6 のような単クローン性の抗体）を 1 週間に 1 回、例えば、2、3、4、5、6、7、8、10、15、20 週間またはそれ以上の週に 1 回投与する。どのような特別の場合でも、一定の投与秩序を乱すことなく、特定の投与規定を、その個人に対して調節し、人への投与あるいは管理を専門医として判断する必要がある。正確な投与量は使用されるポリペプチドによって異なり、ポリペプチドが結合するリガンドとポリペプチドの浄化値によって異なる。例えば、低量の投与では十分に、対腫瘍性効果を挙げない場合には、SAM - 6 抗体の投与量を増加することが出来る。これとは反対に患

者から腫瘍が消滅した場合には、SAM-6抗体の用量を減らすことが出来る。

【00100】

担当している医師が最終的に適切とする量および用量を決定するが、モノクローナル抗体またはその断片は、例えば、体重1kg当り1日約0.1mg乃至50mg或は体重1kg当り毎週0.7mg乃至350mgの範囲内とする。治療に有効な量は例えば約0.50mg/kg乃至20.0mg/kg、更に望ましくは、約0.50mg/kg乃至15.0mg/kgで、例えば約0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0, 8.5, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0, 13.0, 14.0または15.0mg/kg体重を毎日、または隔日、或は1週に2回とする。例えば、適当な投与量は、前述したように投薬された場合、ポリペプチドの量は細胞のアポトーシスを招き、少なくとも20%以上が基礎量（未処理）レベルである。一般に、適当な用量と処置と治療法とが治療および/または予防に良い影響を及ぼす。このような反応は、治療した患者を治療をしなかった患者と較べて、治療した患者は臨床の成果（例えば、病状の軽減、完成または部分的或は長期無症候生存）を達成することが認められたのである。本発明によるならば、ポリペプチドの投与は、当業者にとって周知となっている凡ゆる通常の効力検定によって、未処理の者に対して、少なくとも20%, 40%, 50%または75%以上、腫瘍性の細胞をアポトーシスに導いている。更に好ましいことには、増殖が未処理に較べて80%, 90%, 95%、または100%まで阻止されている。あるいは、ポリペプチドを投与すると、腫瘍性の細胞の増殖を当業者が周知の標準的な効力検定によって測定した場合に、未処理の場合よりも少なくとも20%, 40%, 50%, または75%まで抑制することができる。それ以上に望ましいことには、増殖が当業者が周知している凡ゆる標準の効力検定で未処理のそれよりも80%, 90%, 95%, あるいは100%も下位に増殖をおさえることができる。最高に望ましいことは、ポリペプチドが、増殖を阻止し、未処理の対照細胞に関して腫瘍性の細胞をアポトーシスに導くことである。

こうした反応は当業者が周知の技術で観察することが出来る。一般に、医薬の組成に関して、抗体の量は宿主のkg当り約25μgから5mg/kgの範囲内である。適当とする用量は患者のサイズにより変わるが、一般的には約0.1mLから約5mLである。

【0101】

薬剤組成物の調製

本発明のポリペプチドは適当な手段を以て抗腫瘍性の性質を有する部位に達した時に集中させる結果を招くようにすることにある。ポリペプチドは任意の適当な担体物質中に適切な割合とする量を含ませることができ、通常、組成の総重量の1-95（重量）%の量を存在させる。その組成は非経口投与（例えば、皮下、静脈内、筋肉、または腹腔内）に配剤するのに適する。薬剤の組成は通常の薬剤の処理（例えば、レミングトン（Remington）著：「ザサイエンス アンド プラクティス オブ ファーマシイ」（The Science and Practice of Pharmacy）（20版）、A. R. ジェナロ、リピンコット、ウィリアム及びウィルキンス著（A. R. Gennaro, Lippincott Williams and Wilkins）、2000及びエンサイクロペディア オブ ファーマセウチカル テクノロジー（Encyclopedia of Pharmaceutical Technology）、著作者、ジェー・スワービック及びジー、シー、ボヤン（J. Swabrick and J. C. Boyan）、1988-1999頁、マルセル デッカー（Marcel Dekker）社、ニューヨーク）を参照されたい。

【0102】

医薬の組成は処方箋に基づく投薬の形式で、或は通常の毒性の無い医薬として認められる基材および補助剤を含有する適切な投薬装置または挿入管を介して、注射、注入、また体内移植（皮下、静脈、筋肉内、腹腔内など）に送り込むことが出来る。もしも腫瘍性の細胞が（例えば白血病で）血液と直接に接触していたり、或は腫瘍には専ら静脈（I. V.）のルートで接近することが出来る。腫瘍が、例えば胞腹腔或は腹膜の空洞などの限られ

た場所に生じた場合には、血流を経て送るよりも、直接に空洞中に送り込むことが出来る。このような調合剤の組成および製法は医薬の調剤の技術に於ては周知である。その調剤法はレミントン (Remington) のザサイエンス アンド プラクティス オブ ファーマシ スupra (The Science and Practice of Pharmacy supra.) に記載されている。

【0103】

癌の進行の診断と監視

以上に説明したように、本発明は哺乳類、好ましくはヒトの患者の腫瘍を検出或は診断する方法に関連するものである。一般的に、本発明のポリペプチドの投与は細胞のアポトーシス或は増殖の削減に敏感に働くものである。

【0104】

本発明のポリペプチドは腫瘍または腫瘍の細胞に特効のものであって、通常の細胞または組織には作用しない。したがって、このポリペプチドは腫瘍の内部の腫瘍性の細胞に結合するが、正常な周囲の組織には影響を与えないので、哺乳動物における腫瘍の検出と処理、つまりその両者を行うものである。例えば、生体組織検査を行った結果、すべて腫瘍が除かれたことが証明されたり、或は患者から除かれた腫瘍がポリペプチドとは結合していない細胞によって完全に囲まれていることが立証されることにより、腫瘍が全部除去されたことが判る。標識の選択は最適の感受性を呈する組合せを決定することを基礎とし、またそれを選別するものとする。

【0105】

検出の感度を良好にするために、多数の腫瘍の標識を所定のサンプル或は個人で効力検定する。このようにして、抗体或は異なる抗原に関する機能的断片特定のポリペプチドを単独の効力検定または多数の効力検定で組合わせることが出来る。更に、腫瘍に対する多様なプライマー或はプローブを同時に使用することも出来る。標識の選択は最適の感受性を示す組合せを決める基底となる。

【0106】

生体内での腫瘍の検出

一般に、哺乳動物についての腫瘍の診断は、哺乳動物（例えばヒトの患者）から生物の試料を得て、この試料を本発明のポリペプチド（例えば、SAM-6のような単クローン性の抗体）と接触させ、その試料において、腫瘍性細胞の対照試料との反応性或は結合の度合を検出する。なお、この対照試料は、癌が診断された哺乳類からの、或は腫瘍があるか否か判っていない他の患者からの健康な組織から得た非腫瘍性細胞とする。したがって、本発明の方法は、通常では検出をすることが出来ない、極く早期の腫瘍もしくは転位の検出に特に有用である。それが故に、患者の腫瘍の診断だけでなく、本発明の方法は哺乳動物における腫瘍の進行の観測にも利用することが出来る。その目的のためには、腫瘍の診断に用いる下記に述べた効力検査を、時間を問題に入れることなく、ポリペプチドと結合するレベルを検査する。例えば、効力検定は6ヵ月から1年の期間に亘って、24・72時間毎に行う。そして、それから後、必要に応じて実行する。一般に、腫瘍は時を問題とすることなくポリペプチドの結合の度合が増加した患者においては進行しているのである。これとは対照的に、ポリペプチドの結合が時間の経過によっても一定であったり、或は減少している場合には、腫瘍は進行していないのである。その代り、前述したように、本発明のポリペプチドは、外科手術によって、腫瘍が哺乳動物から完全に除かれたか否かを知るための腫瘍細胞の存在を調べるのにも利用することが出来る。

【0107】

ポリペプチドは、好ましくは、検出を容易にするか、ポリペプチドの反応の測定を容易にする検出可能な物質に結合させることである。生物学上のサンプルは腫瘍性の細胞を含んでいる、例えば、血液、唾液、血清、粘液、痰、尿或は涙などが挙げられる。生物学的試料もまた組織の部分で、固定された組織、新鮮な組織または凍結組織とする。腫瘍は生物学的試料について抗体の反応性のレベルが増加して、対照試料以上に生物学的試料についての抗体の反応性のレベルが上昇する場合に得られた試料である。その増加率は、対照レ

ベルよりも上で、少くとも10%、20%、30%、40%、50%以上である。結合または反応性のレベルは当業者が周知の方法で決定することが出来、更にその詳細については後述する。

【0108】

生体外での診断の効力検定

本発明のポリペプチドを用いての腫瘍の診断は当業者が周知の任意の方法で行うことが出来るもので、サンプルについてポリペプチドの標識を検出する結合剤を用いて行う。例えば、ハーロー氏とラン氏 (Harlow and Lane) 著, 「抗体類」 (Antibodies) アラボラトリー マニュアル, コールド スプリング ハーバー ラボラトリー (A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) 1998年刊を参照のこと。例えば、ポリペプチドは酵素結合免疫吸収剤の効力検定 (ELISA), ウェスタン吸取り、または組織試料の腫瘍細胞の自位検出に用いることが出来る。例えば、ELISA効力検定は生物学的試料の腫瘍細胞に結合する固相に固定化された抗体にポリペプチドを使用することを必要とする。結合腫瘍細胞は検出試薬を使用して検出できるもので、この検出試薬は遺伝子群を含み、抗体/腫瘍細胞複合体に明確に結合する。こうした検出試薬には、例えば、抗体に特別に結合する結合物質があり、その例を挙げると、抗免疫グロブリン, タンパク質G, タンパク質A, またはレクチンなどである。これらに代るべきものとして、競合的の効力検定を利用することが出来る。それについてポリペプチドは抗体であって、抗原は抗体に対して特異性のもので、報告者グループで標識され、生物学的試料を以て抗体の培養後に固定された抗体に結合する。試料の成分が抗体に対して標識された抗原の結合を抑制する要素の範囲は固定された抗体について試料の反応性を指示するものである。患者の腫瘍の診断は2-抗体サンドイッチ効力検定によって決定される。この効力検定は固体支持台に固定された抗体と最初に接触することによって行なわれるもので、前記固定支持台は通常、マイクロタイタープレートの空所で試料内のポリペプチドが固定された抗体に結合される。自由にされた試料は固定したポリペプチド-抗体複合体と検出試薬とから除かれる。(なお前記検出試薬はポリペプチドに異なる部位に結合することの出来る第二の抗体とすることが望ましく)、検出試薬はレポーター群が加えられている。固定支持台に残存する検出試薬の量は固定支持台に結合し、特異のレポーター群について適当とする方法を用いて決定される。例えば、腫瘍の存在の有無、結腸直腸の腺癌、固相支持体に結合したままのレポーター群、これは一般に前決定遮断値に相当するシグナルに比較される。結腸直腸の腺癌などの腫瘍の存在の有無を決定するために、前決定カットオフ値に該当するシグナルに固相支持に結合したままのレポーター群から検出したシグナルを前以て決定された遮断値に相当するシグナルと比較する。腫瘍の検出に当たっての遮断値は、抗体が腫瘍の無い患者からの試料と比較した時に得られた平均シグナルである。

【0109】

レポーター・グループを検出するのに用いられる方法はレポーター・グループの性質による。放射性のグループに関して、シンチレーション計算法またはX線写真法を用いることができる。分光器法も色素, 発光群および蛍光群を検出するのに用いることができる。ピオチンも異なるレポーター類(一般に放射性或は蛍光群または酵素)と共にアビジンを用いて検出することが出来る。酵素レポーター類は基質を(一般に限定された時間)添加して、反応物質を分光器を用いる分析またはその外の分析で検出することが出来る。

【0110】

本発明のポリペプチドは腫瘍細胞の自然位検出または定量測定について組織学的に用いることが、例えば、免疫蛍光法または免疫電子顕微鏡検査法によって出来る。こうした手段を利用することは、検体の腫瘍細胞の検出に役立つだけでなく、その空間分布の測定にも役立つのである。別の例としては、生物学的試料はスライド上の腫瘍細胞を含んでいる生物学的物質の塗抹標本とすることができ、生物学的物質中の腫瘍細胞の検出を顕微鏡の塗抹標本を調べるか、或は血球計算によって標本を調べることによって行うことが出来る。

【0111】

腫瘍の生体検出

代りとなるものとして、本発明の抗体は腫瘍の検出とその所在部位の検出とのために生体に用いることが出来る。この種の方法は、哺乳動物、望ましくはヒトの被検者に、本発明のポリペプチド、例えば検出物質で標識されたSAM-6などを注射することで、例えば、米国特許第4,444,744号に開示されている。例えば、ポリペプチドは患者に対して、薬理学的に不活性の放射性同位体で放射性標識をつけることが出来、患者に投薬される。放射性同位体はフォトスキャンニング装置を用いて哺乳動物に関して検出することができ、目標値に関して増加していれば、腫瘍の検出と位置の確認とに反映する。

【0112】

治療

哺乳動物の腫瘍の診断と監視とに加えて、本発明は、また、哺乳動物、好ましくはヒトの患者の腫瘍を処理する方法を特徴とするものである。その方法は、一般的に、患者に対して、本発明のポリペプチドの生物学的に有効とする量を投与することにある。ポリペプチドは、例えば、静脈または動脈内への注入と同様に、静脈、皮下、粘膜、または空洞内の注射によって、哺乳動物に投与される。したがって、ポリペプチドは患者の血流中にSAM-6抗体として静脈注射するとか、或はポリペプチドを腫瘍の部位に直接注入するか、或は腫瘍細胞に近い場所に注入することが出来る。かくして、ポリペプチドは、全身的に注入することが出来るものであって、例えば、患者の血液の流れの中にSAM-6抗体として静脈注射するか、またはポリペプチドを腫瘍に直に注射し、あるいは腫瘍の細胞に近接する部位に注射する。

【0113】

一般的に、前述したように、本発明のポリペプチドの腫瘍性細胞との結合によって、その細胞のアポトーシスを招き、細胞の増殖を減少させ、対照検体について共に相対的に細胞のアポトーシスと減少との両者を行う。その代りとして、抗体は補体の経路について活性化され、最終的には細胞をアポトーシスに至らせる細胞膜に穿孔すべき孔をあける結果となる。

【0114】

必要に応じて、ポリペプチドを前に述べた薬剤または毒素に共役させることが出来る。一度細胞の表面に結合されると、細胞酵素を切り裂く細胞変性を包み込み、そして共役状態から活性化し、或は薬剤または毒素を遊離する。細胞DNAから僅かに離れた場所において、識別に用いる放射性同位元素抗体について、腫瘍性の細胞に結合して、放射線の放射によって、次の再現時期内に細胞をアポトーシスに導く。例えば、腫瘍が被検者から検出されて、その局所に限定されていることが判れば、通常、患者の体重70kgを基準として、一回の投与量を25乃至250mCi for ^{131}I 、好ましくは50nCi乃至150mCi注射する。その注射は静脈内注射、動脈内注射、リンパ管内注射、腔内照射療法とすることができ、それを1回以上繰り返す。放射性同位元素を用いて識別されたポリペプチドまたはポリペプチド混合物の分割用量、例えば20-120mCi（体重70kgの患者に対して）を数回投薬すると治療にとって極めて有効である。したがって、無処置の細胞の放射を通常、比例的に増加して行うことなく腫瘍に対し細胞のアポトーシスを高度にする。

【0115】

標識されたポリペプチドを使用する治療法は初期の治療法としては頗る利点があるが、この治療と合わせて別の抗腫瘍治療法、例えば放射線および化学療法、および外科の補助などを行うことも出来る。この種の腫瘍に対するポリペプチドの投与は、外科手術では取り除くことが出来ない小さな転位の場合に、特に有効である。

【0116】

ポリペプチドと他の抗腫瘍治療法との組み合わせについて

腫瘍に対する化学療法の薬剤および/または放射線療法および/または外科手術による除去を、本発明の幾つもの方法のいずれかと任意に組み合わせを行うことが出来る。化学療法の薬剤として用いることができる化学物としては、次のものが挙げられる。即ち、アル

キル化薬剤，抗代謝物，天然の生成物およびその誘導薬，ホルモン類およびステロイド類（合成類似化合物を含む）、及び合成薬がある。アルキル化薬剤（例えば窒素マスタード，エチレン基誘導体，アルキルスルホン酸，ニトロソウレア及びトリアジン）はウラシルマスタード，クロルメチン，シクロホスファミド（C y t o x a n^R），イフォスファミド，メルファラン，クロラムブシル，ビボプロマン，トリエチレン - メラミン，トリエチレントリホスラミン，ブスルファン，カルムスチン，ロムスチン，ストレプトゾシン，ダカルバシン及びテモゾロミドを含んでいる。天然の生成物とその派生物（ビンカアルカロイド，抗腫瘍抗生物質，酵素，リンホカイン及びエピボドフィロトキシン）もまた使用することが出来、それらは、例えば、ビンブラスチン，ピンクリスチン，ビンデシン，ブレオマイシン，ダクチノマイシン，ダウノマイシン，ドキシルビシン，エビルビシン，イダルビシン，パクリタキセル（パクリタクセルはタキソール，ミトラマイシン，デオキシルコ・フォルマイシン，マイトマイシン - C，L - アスバラギナーゼ，インターフェロン、特に、I F N - a l p h a），エトポシド、及びテニオポシドとして市販されている。ホルモン及びステロイド（合成アナログを含む）は、例えば、17 - アルファ - エチニルストラジオール、ジエチルスチルベストロール，テストステロン，プレドニソン，フルオキシメステロン，ドロモスタノロン，プロピオン酸塩，テストラクトン，酢酸メゲストロール，タモキシフェン，メチルプレドニソロン，メチルテストステロン，プレドニソロン，トリアムシノロン，クロロトリアニセン，ヒドロキシプロゲステロン，アミノグルテチミド，エストラムスチン，酢酸メドロキシプロゲステロン酢酸塩，ロイプロライド，フルタミド，トレミフェネ、またはゾラデックス、である。模範的な合成薬（白金配位複合体のような無機質の複合体を含んでいる）には、シスプラチン，カルボプラチン，ヒドロキシ尿素，アムサクリン，プロカルバジン，ミトタン，ミトクサントロン，レバミソール及びヘキサメチレントトラミンを挙げることが出来る。

【0117】

これらの化学療法の薬剤の多くの安全で有効な投与についての方法と投薬量とは当業者に周知されている。更に、その投与は標準文献に記載されている。例えば、化学療法の薬剤の多くの投与は「フィシシアンズ・デスク・リフェレンス」（Physicians' Desk Reference）（PDR、例えば、1996年版（メディカル・エコノミックス・コンパニー，モンタル，ニュージャージー07645 - 1742，USA）（Medical Economics Company，Montvale，N.J. 07645 - 1742，USA）、に記載されていて、その書籍の説明を参考文献として、この明細書に組入れたものとする。

【0118】

次に記載する幾つもの例は、本発明の実例を述べるものであって、本発明をこれらの実例にのみに限定すべきではない。

【0119】

例1 原料と方法

細胞培養

この研究に当っては、次のヒトの細胞株を用いた。B X P C - 3（膵臓の腺癌），23132 / 87（胃の腺癌），C O L O - 206F（コロン癌腫），C O L O - 699（肺の腺癌）およびL O U - N H 9 1（肺の鱗状細胞癌腫細胞），R P M I - 2650（鼻の隔壁鱗状細胞癌腫細胞）およびH N E p C - c（正常の鼻の上皮の細胞）。

細胞株はR P M I - 1640培養地（P A A，ウィーン，オーストリア）で10%ウシ胎児血清（F C S）で補充された10%胎児の脛の漿液（F C S），2 mMグルタミン及びペニシリン / ストレプトマイシン（共に1%）と加湿した37 °Cの5% C O₂ 雰囲気において培養された。効力検定に関して述べるために、細胞を集合するように生長させ、トリプシン / E D T Aで分離し、これを使用する前にリン酸塩緩衝食塩水（P B S）で2度洗浄した。

【0120】

ハイブリドーマの製作

次に述べるようにしてH A B - 1 異種骨髓腫に永続性のリンパ球を融合した。そしてH A B - 1 異種骨髓腫を添加物なく毎分1 5 0 0回転の速度で5分間遠心分離した。次で、脾臓あるいはリンパ節の一方から得た溶けたリンパ球或はリンパ結節から解凍したリンパ管を得た。それから、これらの細胞に何等の添加物を加えることなく、これをR P M I 1 6 4 0を用いて2回洗ってから、5分間、毎分1 5 0 0回転して遠心分離して、ノイバウエル細胞計算室で計算した。また再び細胞を洗浄し、H A B - 1細胞とリンパ球とを1 : 2乃至1 : 3の割合に混合して、毎分1 5 0 0回転させて8分間、その混合物を遠心分離した。前以てポリエチレングリコール1 5 0 0 (P E G) を3 7 に暖めて、注意深くP E Gをペレットに滴下し、5 0 m lの管をゆっくりと回転して、ペレット上にP E Gを流した。次で、ペレットをゆっくりと再び懸濁して、3 7 の水浴で正確に9 0秒間、その管を回転した。次で、添加物なしのR P M Iの1 0 m lで細胞を2回洗い、毎分1 5 0 0回転で5分間、遠心分離した。R P M I 1 6 4 0の1 m lをH A Tサブプリメント (P A A , ウィーン, オーストリア) と1 0 % F C S , 1 % グルタミン、および1 % ペニシリン/ ストレプトマイシン (“ R P M I 1 6 4 0 H A T ”) を2 4 - w e l l 板の各w e l l に加えた。それから、2 4 - w e l l 板を3 7 定温器に配置して、R P M I 1 6 4 0 H A T培養基を毎週取り替えた。4週間乃至6週間後に、細胞培養物の上澄の物質を酵素連鎖性の免疫吸着物効力検定 (E L I S A) における抗体を生産するために分離した。

【0 1 2 1】

このプロトコルを用いて、発生されたトリオマス (t r i o m a s) の凡そ8 0 %乃至9 0 %は、生長することが出来るものであって、その凡そ5 0 %は分泌免疫グロブリンである。陽性のクローンは自家移植の腫瘍組織部分に関して免疫組織化学的に試験され、それによって後に再びクローンにされる。

【0 1 2 2】

c D N A合成とR T - P C R

抗体の配列順序を得るために、キアゲン (Q i a g e n) からR N A S Eキット (K i t) を用いてトリオマ (t r i o m a) から総てのR N Aを分離した。全体のR N Aは技術上基準とされている方法を利用して作成した。なお、技術上の基準としては、クレーン氏 (K r e e n) 氏外著 (クリン・E x p . 免疫学) (C l i n . E x p . I m m u n o l . 1 1 5 : 1 6 8 - 1 7 5 頁, 1 9 9 9)、に記載されている。ハイブリドーマ細胞株S A M - 6 から得た全体のR N Aからのc D N A合成は製造家の指示によるギブコ (G i b c o) B R L (エゲンステイン, ドイツ) (E g g e n s t e i n , G e r m a n y) M - M L Vレーバース トランスクリプターゼ (R e v e r s e T r a n s c r i p t a s e) を用いる5 μ g トータルR N Aで行なわれたハイブリドーマ細胞株から得た完全なR N Aからc D N Aを合成する。V_HとV_L遺伝子の増幅修飾物質は1 . 7 5 m M M g C l₂で、2 5 μ l 容量で、0 . 4 p Mプライマー、各d N T Dの2 0 0 μ M、および1 U T a q ポリメラーゼ (M B I フェルメンタス, S t . レオン - ロト, ドイツ) (M B I F e r m e n t a s , S t . L e o n - R o t , G e r m a n y) で行われた。P C R - 生成物は次のサイクルプロフィールを使用して増産された。即ち、(V H 3とV H 4プライマーについて) 2分間; 9 5 、次で3 0秒間9 4 で3 5サイクル; 3 0秒間6 5 , V Lプライマーについて、それぞれV H 1 , V H 2 , V H 5 , V H 6について6 0 、そしてV Lプライマーに関して5 2 ; 7 2 で4分間の最終延長。

【0 1 2 3】

抗体の配列決定法

P C Rをジェットソープ (J e t s o r b) ゲル抽出装置 (ゲノームト, バド, オインハウゼン, ドイツ) (G e n o m e d , B a d O e y n h a u s e n , G e r m a n y) を使用してP C R生成物のゲル抽出に従った2 %アガロースでゲル電気泳動法 (ロス, カルスルー, ドイツ) (R o t h , K a r l s r u h e , G e r m a n y) で精製した。次で、P C R生成物はp C R - S c r i p t A m p S K⁺ クローン化装置 (ストラターゲン, ハイデルベルグ, ドイツ) (S t r a t a g e n e , H e i d e l b e r g , G e r m a n y) を使用してクローン化した。1 0個の陽性のクローンをダイデオキシ (D y e D

e o x y) ターミネーションサイクル配列装置 (アプライトバイオシステムズ インク . , ウェイテルスタッド , ドイツ) (A p p l i e d B i o S y s t e m s I n c . , W e i t e r s t a d t , G e r m a n y) を用いて配列され、A B I P r i s m 3 7 3 自動化 DNA 配列装置) で分析された (前記の両要素は T 3 と T 7 プライマーを使用して配列された) 。それらの配列はウインドウズ (W i n d o w s) 配列比較ソフトウェアの D N A S I S とゲンバンク (G e n B a n k) 及び I M G T / V - Q U E S T データベースを使用して分析された。インターナショナル免疫遺伝学 (“ I M G T ”) データベースは、ユニバーシティ モントペリエール , モントペリエール , フランス (U n i v e r s i t e M o n t p e l l i e r , M o n t p e l l i e r , F r a n c e) のマリー・ポール・レフランク (M a r i e - P a u l e L e f r a n c) によって配位されている。

【 0 1 2 4 】

パラフィン部分の免疫組織化学の染色

パラフィンに埋没させたヒトの組織を切片 (2 μ m) にした。そしてパラフィンを次のようにして除いた。

【 0 1 2 5 】

パラフィンの除去 :

- ・キシレン 1 5 滴
- ・キシレン 2 5 滴
- ・ 1 0 0 % エタノール 1 5 滴
- ・ 1 0 0 % エタノール 2 5 滴
- ・メタノール (7 0 m l) + H ₂ O ₂ (5 0 0 μ l) 5 滴
- ・ 9 0 % エタノール 1 3 滴
- ・ 9 0 % エタノール 2 3 滴
- ・ 8 0 % エタノール 1 3 滴
- ・ 8 0 % エタノール 2 3 滴
- ・ 7 0 % エタノール 1 3 滴
- ・ 7 0 % エタノール 2 3 滴
- ・ T r i s / N a C l で 1 回 洗 う
- ・加熱 : 3 0 0 m l d e s t . 圧力加熱器にクエン酸を入れて 5 分間加熱
- ・ B S A / P B S , 顕微鏡のスライド 1 枚当り 1 5 0 μ l で 1 5 分遮断
- ・ T r i s / N a C l で 1 回 洗 浄
- ・第一の抗体 : 顕微鏡のスライド 1 枚当り 1 5 0 μ l , 加湿された容器において 3 7 の温度で 2 . 5 時間培養
- ・ T r i s / N a C l で 3 回 洗 浄
- ・第二の抗体 : 顕微鏡のスライド 1 枚当り 1 5 0 μ l , 室温で加湿した容器内にて 4 5 分間培養 (7 0 0 μ l P B S + 3 0 0 μ l A B - 2 プラズマ + 2 0 μ l 抗体)
- ・ T r i s / N a C l で 3 回 洗 浄
- ・ P B S に 1 0 分間置く
- ・ジアミノベンチジン (0 . 0 5 %) - 過酸化水素 (0 . 0 2 %) で 1 0 分間培養 : 顕微鏡スライド当たり 1 5 0 μ l
- ・ H ₂ O で 3 回 洗 浄 , 次で蒸留した H ₂ O で 1 回 洗 浄
- ・血毒素中に 5 分間入れておく
- ・水道水を 1 0 乃至 1 5 分流す中に置く
- ・蒸留した H ₂ O で洗浄
- ・グリセロールゼラチンで被覆

【 0 1 2 6 】

腫瘍細胞膜抽出物の調製

腫瘍細胞よりの細胞膜の分離は、例えばエンセル氏 (H e n s e l) 外の (I n t . J . C a n c e r 8 1 : 2 2 9 - 2 3 5 , 1 9 9 9) に記載されているように、技術上の標準的な方法を利用して、その記載の通りに行なわれた。特に、融合した腫瘍細胞 (B X P C

- 3と23132/87)はPBSで二度洗浄し、細胞剥離器で組織回収し、低張緩衝液(20mM HEPES, 3mM Cl, 3mM MgCl₂)中に再度懸濁し、冷蔵庫に入れて15分培養した。次で細胞を5分間音波によって破碎し、核を10分間10,000×gにて遠心分離して小球(ペレット)にした。上澄み液は膜を小球にするためにスウィング-アウト(swing-out)ローターで、100,000×gについて40分間遠心分離した。できた小球を低張緩衝液で洗浄した後に、その小球を膜溶解緩衝液(50mM HEPES pH7.4, 0.1mM EDTA, 10%グリセロール及び1%三重陽子X-100)に再び懸濁した。完全なタンパク質分解酵素抑制因子(ボエヒリンジャー, マンハイム, ドイツ)(Boehringer, Mannheim, Germany)もまた総ての溶液に加えられた。

【0127】

ウエスタンブロッティング

ウエスタンブロットは、例えばヘンセル氏外(Hensel et al.)の(イント. J. Cancer 81:229-235頁, 1999)(Int. J. Cancer 81:229-235, 1999)に記載の標準技術を用いて行なわれた。要約すると、ブロット法を利用したニトロセルロース膜を3%低脂肪ミルクパウダーを含有するPBSで遮断し、次で、SAM-6ヒト1gM抗体または関連のないヒト対照IgM(クロムピウアIgM, ジアノバ)(ChromPure IgM, Dianova)の20-40μgで1時間痂皮形成を行った。二次抗体(ペルオキシダーゼ連結ウサギ抗ヒトIgM抗体1:1, 000, ジアノバ)をピアース(Pierce)(KMF, St. オーガスチン, ドイツ)(KMF, St. Augustin, Germany)からスーパーシグナル(SUPER SIGNAL)化学ルミネッセンスキットで検出した。

【0128】

超微構造研究

癒着性進行性胃癌細胞株23132/87を指示された期間10μg/ml SAM-6抗体または関連のないヒト対照IgMで指示された時間をかけて培養した。次で載せたガラスをソエレエンセン(Soerensen)緩衝液pH7.4(ラスター電子顕微鏡のため)で2.5%グルタルアルデヒド(電子顕微鏡)或は6.25%グルタルアルデヒドで固定し、顕微鏡検査分析のために調製した。細胞の形態学を電子顕微鏡と透過型電子顕微鏡とを走査して調べた。

【0129】

ズダンIII染色

細胞内の脂質を染色するために、胃癌細胞23132/87をガラス・スライド上で育成した。付着細胞を抗体SAM-6(30μg/ml)で48時間培養した。リン酸塩緩衝生理的食塩水で2回洗浄した後に、細胞を60%イソプラパノールで5分間固定した。使用前に、ズダンIII株の60%溶液(100%イソプラパノール中ズダン0.5%)を一晩成熟し、濾過して、固定した細胞に加えた。15分後に、細胞を蒸留したH₂Oで洗浄し、60%イソプラパノール中で分化し、再び洗浄し、それから6分間メイヤーズヘマラム洗色液で洗色した。最後に、細胞を10分間洗浄し、蒸留したH₂Oで洗い、グリセロゼラチンを付けた。

【0130】

ナイルレッド染色

フェノキサジン染料で染色する中性の脂質を(グリーンスパン, P., メイヤー, E.P., とフォウラー, D. ナイルレッド: アセレクトィブ フローレスセント フォア イントラセルラー リピッドドロップレット. J. セルビオル. 100, 965-973, 1985)(Greenspan, P., Mayer, E.P., and Fowler, D. Nile Red: A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets. J. Cell Biol. 100, 965-973, 1985)に以前に述べた通りに行なった。簡単に述べると、胃癌細胞23132/87をガラス板上にて生長させ、付着細胞を48時間SAM-6抗体(

30 g / ml) で培養し、それから5分間1.5%グルタルアルデヒドで固定し、HEPES緩衝液で洗浄し、HEPES緩衝液(アセトンについて1 mg / ml ナイルレッドの保存溶液)の1:200希釈液で培養した。HEPES緩衝液で更に洗浄した後に、細胞核を8分間DAPI(水で1:1000に希釈)で染色した。それから細胞を再度洗浄してフルオロマウント-G(Fluoromount-G)(SOUTHERNバイオテクノロジー ASS., Inc., 米国)(SOUTHERNBio technology Ass., Inc., USA)に乗せた。蛍光分析をLeicaTCS SP2同焦点レーザー顕微鏡で行った。極性脂質は暗赤色(543 nm)に染色され、中性の脂質は黄色(488 nm)に染色され、細胞核は青色(350 nm)に染色された。

【0131】

oxLDLの検出

LDL(シグマ, タウフキルヘン, ドイツ)(Sigma, Taufkirchen, Germany)が20 μ M CuSO₄で15時間づつ3回かけて培養して酸化させた。酸化されたLDLの量をメルコディア酸化LDL ELISA(メルコディア, ウプサラ, スウェーデン)(Merckodia, Uppsala, Sweden)で決定した。

【0132】

メルコディア酸化LDL ELISAは固相2部位酵素免疫学的検定である。これは直接のサンドイッチテクニックを基本とするもので、2つの単クローン性の抗体を酸化させたアポリタンパクB分子について異なる抗原の決定因子に指向される。試料の培養酸化LDLが抗酸化LDLと反応しているうちに、抗体はマイクロ滴定に十分に結合する。非反応性細胞質成分を除去するための洗浄後に、ペルオキシダーゼ接合抗ヒトアポリタンパクB抗体は酸化したLDLを固相に結合することを認めるものである。2番目の培養と結合していない酵素の標識を付けた抗体とを除く単一の洗浄後に、結合配合体を3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジン(TMB)と反応させて検出した。その反応は450 nmで分光測光的に読み取れる比色法の端点を付与するために加えて停止された。

【0133】

SAM-6-oxLDL相互作用計量

可撓性の平底96-井戸型平板(ベクトン ディッキンソン ラブウワー ヨーロッパ, フランス)(Becton Dickinson Labware Europe, France)を4の温度で一晩中、異なる酸化LDLで培養した。次で、平板を1時間10% FCSを含有するRPMI-1640媒質を用いて遮断した。その後に、その平板を37の温度で1時間PBSで薄めた60 μ g / ml SAM-6抗体で培養した。PBSで3回洗浄してから、PBSで1:1,000に希薄したHRP-連結二次抗体(ウサギ抗ヒトIgM, ダコ, ハンバーグ, ドイツ)(Dako, Hamburg, Germany)で培養した。それから倍地をPBSで一度洗浄し、クエン酸塩緩衝液で二度洗浄し、OPD(ダコサイトマチオン, グロストラップ, デンマーク)(Dako Cytomation, Glostrup, Denmark)とエライザーリーダー(ELISA-reader)において490 nmの測定とを行った。

【0134】

細胞内で強化された脂質のクロマトグラフィー分析

BXPC-3細胞類を、それぞれヒトに無関係の対照免疫グロブリン(クロムピューアIgM, ダイアノバ, ドイツ)(Chrompure IgM, Dianova, Germany)を24時間30 μ g SAM-6抗体を培養した。次で、細胞類をトリブシン/EDTAを用いて剥離し、次でPBSでSteppsを2度洗浄した。細胞ペレットを使用するまで20で貯蔵した。脂質を細胞ペレットから取り出した。その取り出された脂質は250 μ l クロロホルム/メタノール(2:1)に溶解され、10回別々に25 μ l が(SiO₂, シリカゲルで被覆された)薄層クロマトグラフィー平板の起始点において拡散培養された。外部右側と左側とにおいて、異なる周知の脂質(コレステロールエステル, コレステロール, トリグリセリド, オレイン酸, ホスパチジレサノルアミン, ホスファチジルコリン, スフィンゴミエリン)が詰められた。極性を持たないために脂質ヘキサ

ン / 酢酸エチル / 酢酸 (9 0 / 1 0 / 1) がリン脂質等、クロロホルム / メタノール / H_2O (7 0 / 3 0 / 5) のための有機溶剤として使用される。染色は、「ケーギミーシェル」(Kagi-miescher) エアゾール試薬 (酢酸で溶解されたアニスアルデヒド / 硫酸) を用い色付けが最適の状態になるまで 1 5 0 での加熱を続けた。

【 0 1 3 5 】

生体における S A M - 6 活性の検出

生体における腫瘍細胞の生長に関する抗体 S A M - 6 の効果を確定するために、s c i d - マウス / ヒト脾臓腫瘍細胞システムを用いた。C , B - 1 7 / I c r H a n H a d - s c i d m i c e (ハーラン ウィンケルマン ゲーエムベーハー , ボルチェン , ドイツ) (H a r l a n W i n k e l m a n n G m b H , B o r c h e n , G e r m a n y) (材 齢 6 - 8 週 , $n = 10$ per group) を皮下に a t d a y 0 で 2×10^6 ヒト脾臓腺癌細胞株 (B X P C - 3) を接種し、1 , 3 , 5 , 7 および 9 日毎に S A M - 6 抗体に i . p . ポスト癌腫細胞を S A M - 6 抗体 ($200 \mu g$) の注射で行った。複数の実験対照用マウスに同じ濃度で関連の無いヒト I g M (クロンピューア I g M , ディアノバ , ハンブルグ , ドイツ) (C h r o m p u r e I g M , D i a n o v a , H a m b u r g , G e r m a n y) を同じ濃度で注射した。可視腫瘍生長を実験中肉眼で測定した。それらの実験は腫瘍が最大の許容サイズ (d a y 2 5) に到達した時に終了したので、実験対称マウスは犠牲になり、腫瘍容量と腫瘍重量とが測定された。

【 0 1 3 6 】

例 2 S A M - 6 単クローン性抗体を発現する細胞株の発生

前述した通り、ヘテロ骨髄腫細胞株 H A B - 1 (ファラー氏外著 , B r . J . 癌 6 2 : 5 9 5 - 5 9 8 頁 , 1 9 9 0) (F a l l e r , e t . a l . , B r . J . C a n c e r 6 2 : 5 9 5 - 5 9 8 , 1 9 9 0) で癌患者の脾臓或はリンパ節から得たリンパ球を溶融してハイブリドーマを発現する S A M - 6 モノクローナル抗体を得た。リンパ様の線源は患者の年齢や性別について前以てそれを選択しなかった。終結の細胞は 3 つの細胞の融合のように、トリオマ (t r i o m a) として知られているハイブリドーマの型式のものである。正常の B - リンパ球のように、このトリオマ (t r i o m a) は抗体を造り出す能力がある。トリオマの特殊性は 3 種類の細胞の融合のようなものである。正常の B - リンパ球のように、このトリオマは抗体を作り出す能力を備えている。抗体の特殊性はトリオマを発生するために利用された患者からの最初のリンパ球の特異性によってきまるのである。

【 0 1 3 7 】

ハイブリドーマ上澄みは E L I S A 効力検定に使用する抗体生産のために選別される。E L I S A に次で、抗体が腫瘍の特異的反応性のために他の部位に移植するのに逆らって免疫組織化学的に一次検定された。S A M - 6 抗体が腺癌の患者の胃から発生された。

【 0 1 3 8 】

ヒトのモノクローナル抗体 S A M - 6 の軽鎖の可変領域のアミノ酸配列 (S E Q I D N O : 1) と核酸配列 (S E Q I D N O : 2) を図 8 a と 8 b とに示してある。ヒトのモノクローナル抗体 S A M - 6 の重鎖の可変領域のアミノ酸配列 (S E Q I D N O : 3) と核酸配列 (S E Q I D N O : 4) は図 9 a と 9 b とに示してある。図 8 b と 9 b とにおいては、異なる相補性決定領域 (C D R s) が示してある。ポリペプチド配列の相補性決定領域 (C D R s) はアミノ酸配列から成っていて、その配列は次に示すアミノ酸配列と実質的に同一である。その配列は、S e r - G l y - A s p - L y s - L e u - G l y - A s p - L y s - T y r - A l a - C y s (C D R 1) , G l n - A s p - S e r - L y s - A r g - P r o - S e r (C D R 2) と軽鎖 (V_L) の可変領域の G l n - A l a - T r p - A s p S e r - S e r - l l e - V a l - V a l (C D R 3) である。一方、ポリペプチドアミノ酸配列の補足性決定領域 (C D R s) は次に示すアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列から成っている。前記アミノ酸配列は S e r - T y r - A l a - M e t - H i s (C D R 1) , V a l - l l e - S e r - T y r - A s p - G l y - S e r - A s n - L y s - T y r - T y r - A l a - A s p - S e r - V a l - L y s - G l y (C D

R2) 及びL鎖(V_H)の可変領域のSEQIDNO:3のAsp-Arg-Leu-Ala-Val-Ala-Gly-Lys-Thr-Phe-Asp-Tyr(CDR3)である。ポリペプチドアミノ酸配列の相補性の決定領域(CDRs)は次に示すアミノ酸配列と全く同一のアミノ酸配列から成っている。なお、前記アミノ酸配列は、次の通りである。軽鎖(V_H)の可変領域のSer-Tyr-Ala-Met-His(CDR1), Val-Ile-Ser-Tyr-Asp-Gly-Ser-Asn-Lys-Tyr-Ala-Asp-Ser-Val-Lys-Gly(CDR2)及びAsp-Arg-Leu-Ala-Val-Ala-Gly-Lys-Thr-Phe-Asp-Tyr(CDR3)。

【0139】

例3 抗体の免疫組織化学の特性

ハイブリドーマによって分泌されたモノクローナル抗体を特徴づけるために、原料と方法とに述べられているように免疫ペルオキシダーゼ効力検定を利用して抗体を正常のパネルと腫瘍組織に対して抗体を試験した。この効力検定によって、抗体によって染色された組織と抗原の分布の概観が判った。

【0140】

腫瘍細胞については明確であるが、通常の組織については特に明確でない抗体が更に特徴づけられた。最初、これらの抗体を異なる患者たちから得た同じタイプの腫瘍に対してテストした。次で、これらの抗体を別の臓器の腫瘍に対してテストし、最後に正常の組織について試験した。これらの効力検定で、ヒトSAM-6モノクローナル抗体が同一であることを認めた。この研究で生成され、記載した腫瘍に反応する抗体はIgM/複基準のものである(表1を参照)。

【表1】

表1:モノクローナルIgM抗体と癌患者の臨床上のデータ

抗体	器官	腫瘍の種類	腫瘍の病期	腫瘍の度	年齢	性別	リンパ球の原因	Ig階級
SAM-6	胃	腺癌	T ₂ N ₂	G3	51	男	脾臓	IgM/λ

【0141】

このヒトモノクローナルIgM抗体の遺伝の原点を調べるために、V_H及びV_L遺伝子を増幅し、クローン化して配列した。その配列を、最も同族体の生殖細胞遺伝子と同定し、体細胞の突然変位を検出するために多数の同族体の生殖細胞系遺伝子と同定するためにIMGT/V-QUESTについて生殖細胞系と比較した。その結果は表2に示してある。

【表2】

	重鎖	軽鎖
生殖細胞系遺伝子	IgHV3-30.3+01	IgL V3-1+01
相同性(%)	100	99.5
R/S組織体	0/0	1/0
R/S CDR	0/0	0/0

【 0 1 4 2 】

生殖細胞遺伝子についての V_H 領域の高度相同性 (1 0 0 %) と低 R / S 比率は、抗体の親和性亢進の指示であって、その抗体が抗原近接性に基づいて変化されなかったことを示す。 V_L 体節の塩基配列は快適相同性 V_L 生殖細胞遺伝子に対して更に高い。そのデータは S A M - 6 抗体が自然非親和性の成熟した抗体のファミリーに属することを示している。

【 0 1 4 3 】

自己腫瘍に関する最初の検査の後に、抗体の反応パターンを免疫組織化学染色を利用してパラフィン埋設癌腫と通常の組織とに染色した。S A M - 6 抗体は正常の組織と共に結合作用を示さなかった (表 3 参照) 。

【 表 3 】

モノクローナル S A M - 6 抗体と正常の組織に対する反応パターン

組 織	S A M - 6
食 道	—
胃	—
結 腸	—
膵 臓	—
肺	—
胸	—
子 宮	—
甲状腺	—
辜 丸	—

【 0 1 4 4 】

前記と対比して、S A M - 6 抗体が異なる腫瘍組織に対する反応パターンを表 4 に示す。

【 表 4 】

モノクローナル I g M S A M - 6 抗体の腫瘍細胞に反応するパターン

組 織	癌腫の種類	P O S	N e g
食 道	扁平細胞	3	0
	腺 (バレット)	4	0
胃	腺 (びまん性)	4	0
	腺 (腸の)	3	0
結 腸	腺	3	0
膵 臓	腺 (管の)	3	0
肺	腺	3	0
	扁平細胞	3	1
胸	侵入性 (管の)	4	0
	侵入性 (小葉の)	4	0
卵 巣	腺	3	0
子 宮	腺	4	0
前立腺	腺	5	2

【 0 1 4 5 】

抗体 S A M - 6 の陽性反応は明瞭に陽性反応が胃の腺癌に限定されず、その他、胸の侵入性小葉癌腫にも観察された (図 1 A)、また結腸の腺癌も観察され (図 1 B)、そして食道の扁平細胞癌腫も観察された (図 1 C)。これらの実験に使用した陽性対照抗体はヒト細胞 5 / 6 に対抗するマウスモノクローナル抗体であった (“ C K 5 / 6 ; ” ダコ A / S デンマーク) またはヒトサイトケラチンに対抗するマウスモノクローナル抗体であった (

“CAM 5.2;”ベクトン ディクキンソン, ニュージャージー) (CAM 5.2; Becton Dickinson, New Jersey)。

【0146】

抗体で認められた抗原を調べるために、株化癌腫細胞株の膜抽出物で行なわれた。抗体SAM-6は胃癌腫細胞株23132/87と膵臓腺癌細胞株BXP-3とに一本の特異沈降線を生成した。抗体SAM-6は凡そ140 kDaの膜タンパクと反応した(図3A)。IgM抗体が膜抽出物非特異性結合を除外するために、対照として非関連ヒト対照IgMを使用した。

【0147】

例4 抗体がアポトーシスを誘導するか否かの決定

抗体が細胞をアポトーシスに導くのであれば多くの効力検定基準を利用することが出来る。

【0148】

例えば、SAM-6抗体が細胞死を招く程度を分析するために細胞死探知エライザ^{PLS}(ローシュ, マンハイム, ドイツ)(Roche, Mannheim, Germany)を利用した。細胞死探知エライザはDNAとヒストンとのそれぞれに対して作用した定量サンドイッチ-酵素-免疫測定法原理を基礎とするものであった。その効力検定は細胞のアポトーシスで死んだ細胞の細胞質に放出されたモノ-及びオリゴヌクレオソームを特定するのに役立つのである。

【0149】

特に、 1×10^4 腫瘍細胞(BXP-3, 23132/87, RPMI-2650及びHNEpC-c)を96-ウェルプレートの上に平に載せて、CO₂恒温器において7%CO₂を37で24時間、濃度の異なるヒトIgM-抗体の存在中で培養した。無関係なIgM抗体で枯渇した細胞培養上澄みが負の制御として役立った。培養期間後に、細胞を10分間かけて遠心分離し、その上澄みを除去した。その結果生じた細胞を、次で、室温において30分間、溶解-緩衝液を用いて培養した。その上澄みを遠心分離した後、これをストレプトアビシン被覆マイクロタイタープレート(MTP)と免疫試薬(10%抗ヒストン-ビオチン, 10%抗DNA-ペルオキシターゼ)(抗-DNAPOD)と80%培養緩衝液をMTP振盪機を毎分250回転させ、室温において2時間、その培養前に添加した。次に、潜伏期の後に、非結合成分を培養緩衝液で洗液段階により除去した。PODはABTS^TMで側光法で基質(1ABTS^TM(2, 2'-アジノ-di[3-エチル-ベンズ-チアゾン-スフォナト]5ml基質緩衝剤)の錠剤として決定された。抗体-誘導細胞死は対照液としてABTS^TMと比較して405nmの波長でELISA(酵素標識免疫吸着測定法)を利用して、この反応の結果として形成された緑色沈殿物の色の強度を決定して測定された(凡そ490nmの参考波長)。この色の強度を基準として、抗体誘導細胞のアポトーシスのレベルを計算した。これらの検査によって培養の48時間後、癌腫細胞に細胞死が誘発された(図3B)。

【0150】

同図のY軸は参考波長415nm及び490nm(A₄₁₅-A₄₉₀)における吸光度の差で、負の制御はRPMI1640培養液である。SAM-6抗体の濃度は上澄みにおいて、両方とも4µg/mlであった。

【0151】

例5 抗体が細胞の増殖を阻止するか否かの決定

細胞の増殖は技術上標準とされている多くの方法、例えばテトラゾリウム塩類によって効力検定することが出来る。黄色テトラゾリウム塩3-(4, 5-ジメチルチアゾール-2-yl)-2, 5-ジフェニルテトラゾリウム臭化物(“MTT”)(シグマ, セント・ルイ, MO)(Sigma, St. Louis, MO)、が代謝的に能動性の細胞により、一部NADH及びNADPHなどの当量を減ずるミトコンドリアの脱水素酵素の作用によって幾分か減少する。結果的に細胞内の紫ホルマゼンが光学分析手段によって可溶化され定量化される。MTT細胞増殖効力検定は細胞増殖の速度を測定し、代謝性事象は細

胞をアポトーシスに導き、細胞の生存能力は縮小する。

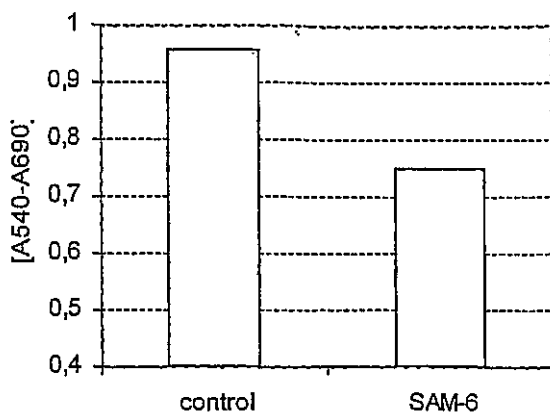
【 0 1 5 2 】

M T T 効力検定のために、細胞 (2 3 1 3 2 / 8 7) の抗トリブシン性を破壊し、10 % ウシ胎児血清 (F C S)、1 % グルタミンおよび1 % ペニシリン / ストレプトマイシン (完全培地) を含有する P R M I - 1 4 6 0 媒質 1 0 m l に前記細胞を再び懸濁した。次で細胞を計数し、 1×10^6 細胞 / m l に希釈した。この懸濁物の $50 \mu\text{l}$ を 9 6 - ウェルプレート (容器) の容器の中でピペット操作し、凡そ 5×10^4 細胞 / 容器のものとした。容器の最初の列は空所にしておいた。次に、各容器に対して完全な培養液に希釈した抗体の $50 \mu\text{l}$ を加えた。次で、9 6 - 井戸型平板を 3 7 °C 恒温器内で 2 4 時間かけて培養した。潜伏期の後に、 $50 \mu\text{l}$ M T T 溶液 (P B S 中に $5 \text{ mg} / \text{ml}$) を各容器に加えた。9 6 - 井戸型平板を 3 7 °C で 3 0 分間培養し、8 0 0 g において 5 分間遠心分離した。その上澄みを吸引し、ジメチル - サルフォ酸化物 (D M S O) を各容器に加え、細胞ペレットを再懸濁した。E L I S A (酵素標識免疫吸着測定器) にて 5 4 0 n m の波長と 6 9 0 n m の基準波長とで吸収が決定された。

【 0 1 5 3 】

2 4 時間後、腫瘍細胞株は S A M - 6 抗体抑制細胞株の細胞増殖を抑制した。その間、枯渇した細胞培養上澄みは変化することが無かった (表 5 参照)。

【 表 5 】



【 0 1 5 4 】

例 6 腫瘍の生体イメージング

結腸癌腫のような腫瘍にかかっていると思われる患者には、放射性ヨウ素化 S A M - 6 抗体の投与量を与えることができ、或は他の腫瘍の特効薬ポリペプチドを与えることが出来る。この明細書に記載した方法を用いて放射性標識を付けた非特異性抗体を与えることが出来る。画像化するための腫瘍の集積はゴールドンバーグ (G o l d e n b e r g) 氏外の方法によって実行することが出来る (N . E n g l , J . M e d . , 2 9 8 : 1 3 8 4 , 1 9 7 8)。静脈注射によって、 ^{131}I - S A M - 6 抗体と T c - 9 9 m 標識付非特異的抗体を患者に投薬することも出来る。試薬 I . V . の投薬に先立って、患者を抗体調合製剤 (標識なし) に対する過敏性或は同種類の抗体に対して抗体調合製剤を予備調査する。 ^{131}I の甲状腺摂取率を遮断するために、ルゴール液を、放射性ヨウ素化抗体を注入する 1 日または数日前に、日に 2 回または 3 回 5 滴経口投与する。人体のいろいろな部位の画像および観察を標識を付した調合薬の注射後 4 , 8 及び 2 4 時間に行う。もしも、腫瘍、例えば、結腸直腸の腺癌が、ガンマカメラによって、デランド (D e l a n d) 氏外 (C a n c e r R e s . 4 0 : 3 0 4 6 , 1 9 8 0) によって、 ^{131}I と標識されたような ^{131}I 標識付き a n t i - C E A 抗体と T c - 9 9 m - 標識付きヒト血清アルブミンから T c - 9 9 m 計数の減殺で画像化するガンマカメラで検出される。注射後 8 時間に、画像化されたイメージングは通常、明瞭で、2 4 時間まで走査してもイメージングを明

瞭で改善される。

【 0 1 5 5 】

例 7 標識付き抗体混合物を用いる腫瘍の治療

腫瘍である診断をされた患者、例えば胸の癌であると診断を受けた女性の患者を本発明のポリペプチドを用いて次のように処置した。ルゴール用機器を毎回 3 回例えば 7 滴投与した。次で、 ^{131}I -SAM-6 抗体の治療投与量を患者に投薬した。例えば、 ^{131}I の 50 mCi の投与量を 3 週間、各週に与え、次いで感覚を個人差を考慮し、例えば 3 ヶ月間、血液額の毒性が中断するまで繰り返した。正確な処置の治療方式は、処置を管理する医師によって一般的に決められる。放射性ヨウ素抗体を生理的食塩水 50 ml 中に静脈内に投与した。3 度目投与後に、最初の腫瘍の大きさが減少し、転移も注目された。特に第 2 回目の治療サイクル、あるいは 10 週間後に注目されたのである。

【 0 1 5 6 】

例 8 共役抗体を用いる処理

腫瘍、例えば胸と肺とに転位した乳癌の女性の患者を ^{131}I -SAM-6, ^{10}B -SAM-6 及び Tc-99m の標識付き非特異的抗体の溶液を用いて治療した。(無菌の生理食塩水 50 ml 中の) ^{131}I -標識付き SAM-6 抗体の量は体重 70 kg の患者を対称として投与された ^{131}I 活動度の 100 mCi を供給するのに充分であった。この投薬量は抗体の分子当り 40 - 80 ホウ素 - 10 原子を具備する抗体の 3.3 mg に同等する。

腫瘍は前記例 6 の方法を適用して最初に精密に局在化された。更に、ルゴール液を、前記の例に述べたように、患者に継続して投与した。熱中性子の完全に照準のあった線束を特定の腫瘍部位に集束した。8 - 20 分間に送られた 400 - 800 放射線吸収線量の外部中性子ビームが各腫瘍部位に作用し、個人を基礎として間隔を調節して放射性標識付きまたは標識無しで、腫瘍局在抗体の投与が任意に繰り返えされた。しかし同時に外部放射療法を行うことなしに総量 3200 の放射線吸収線量を越えることがなければ、治療することが適用された。所望するならば、この治療に加えて、化学療法薬などの抗腫瘍形成物質を患者に投与することも出来る。

【 0 1 5 7 】

その他の実施態様

本発明は、その特定の複数の実施態様に関して説明したのであるが、更なる変更を行うことが出来ることは了解されることと確信する。本発明は各種の変更、用法、適応手段をも包含するものであって、この方面の当業者はこれまでに詳述した主要な内容を適用することが可能である。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 5 8 】

【 図 1 】本発明における腫瘍組織についての抗体 SAM-6 による免疫組織化学による染色法を示す。

【 図 2 】正常な組織に関する抗体 SAM-6 による免疫化学療法染色法を示す。

【 図 3 A 】胃癌細胞株 23132 / 87 と膵臓癌腫腺 BXP C - 3 から抽出した膜タンパク質がニトロセルローズに吸い取り、抗体 SAM-6 で着色したものを示す図。

【 図 3 B 】抗体 SAM-6 のアポトーシス活動度を細胞死亡検出 ELISA^{PLUS}によって探索したものを示す図。

【 図 3 C 】抗体 SAM-6 誘導アポトーシスの形態学的な変化を胃癌について、膵臓癌腫細胞とについて示す図。

【 図 4 】電子顕微鏡を走査して SAM-6 抗体アポトーシスの細胞を誘導した映像を示す。

【 図 5 】透過型電子顕微鏡 (TEM) 検査の結果を示す。

【 図 6 】誘導脂質蓄積を検査するために、スダン III による染色検査法の結果を示す。

【 図 7 】細胞の脂質をニールレッド検査法による実験の結果を示す。

【 図 8 A 】CuSO₄ で LDL を培養して oxLDL の量が増加することを示す。

【図 8 B】oxLDL が SAM - 6 抗体の好ましい結合パートナーであることを示す。

【図 9 a】薄層クロマトグラフィーで分析した培養細胞の脂質の組成を示す。

【図 9 b】薄層クロマトグラフィーによって更に分析された図 9 a に示した実験の高分子脂質。

【図 10 a】SAM - 6 抗体または制御抗体で処理された腫瘍接種マウスで生体内で行った実験の結果を示す。

【図 10 b】SAM - 6 抗体または制御抗体で処理された腫瘍接種マウスで生体内で行った実験の結果を示す。