

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4488351号  
(P4488351)

(45) 発行日 平成22年6月23日 (2010. 6. 23)

(24) 登録日 平成22年4月9日 (2010. 4. 9)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 14/82 (2006. 01)

C O 7 K 14/82 Z N A

C O 7 K 16/40 (2006. 01)

C O 7 K 16/40

C O 7 K 16/32 (2006. 01)

C O 7 K 16/32

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 5/10 (2006. 01)

C 1 2 N 5/00 1 O 2

請求項の数 19 (全 92 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-508271 (P2004-508271)  
 (86) (22) 出願日 平成15年2月21日 (2003. 2. 21)  
 (65) 公表番号 特表2005-535601 (P2005-535601A)  
 (43) 公表日 平成17年11月24日 (2005. 11. 24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/005136  
 (87) 国際公開番号 W02003/100029  
 (87) 国際公開日 平成15年12月4日 (2003. 12. 4)  
 審査請求日 平成17年8月8日 (2005. 8. 8)  
 (31) 優先権主張番号 60/383, 068  
 (32) 優先日 平成14年5月23日 (2002. 5. 23)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/431, 499  
 (32) 優先日 平成14年12月5日 (2002. 12. 5)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 501161745  
 インスティトゥート オブ ヴァイロロジ  
 ー  
 スロヴァキア共和国 8 4 2 4 6 ブラ  
 ティスラーヴァ ドゥブラフスカ セスタ  
 9 スロヴァック アカデミー オブ  
 サイエンス  
 (74) 代理人 100073184  
 弁理士 柳田 征史  
 (74) 代理人 100090468  
 弁理士 佐久間 剛  
 (74) 復代理人 100116540  
 弁理士 河野 香

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 可溶型の炭酸脱水酵素 I X (s-C A I X)、s-C A I Xを検出するためのアッセイ、C A I XとHER-2/neu/c-erbB-2の同時発現、非免疫優性エピトープに対するC A I

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト体液中の可溶型ヒトMN/CA IX抗原を検出または検出および定量する方法であって、

(a) 前記ヒト体液の試料に、ヒトMN/CA IX抗原に特異的に結合する抗体および/またはMN/CA IX抗原に特異的に結合する抗体断片の2つ以上を接触させ；

(b) 前記試料における前記抗体および/または抗体断片の結合を検出または検出および定量する；工程を含み、

前記抗体および/または抗体断片の少なくとも1つが、ヒトMN/CA IX抗原の炭酸脱水酵素(CA)ドメインに特異的なものであり、さらに、前記抗体および/または抗体断片の少なくとも1つが、ヒトMN/CA IX抗原のプロテオグリカン様(PG)ドメインに特異的なものであることを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記抗体および/または抗体断片の少なくとも1つが標識されていることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項 3】

ウェスタンブロット、酵素結合免疫吸着法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ、競合イムノアッセイ、二抗体サンドイッチ法、免疫組織化学染色法、凝集法、および蛍光イムノアッセイより成る群から選択される様式で実施されることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項 4】

前記抗体および／または抗体断片が、ヒトの前癌細胞および／または癌細胞から体液中に放出された可溶性ヒトMN/CA IX抗原に特異的に結合することを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項5】

前記抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項6】

前記プロテオグリカン様(PG)ドメインに特異的な抗体が、米国バージニア州マナッサスのAmerican Type Culture Collection (ATCC)に受託番号HB11128として寄託されたハイブリドーマVU-M75から分泌されるM75モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項5記載の方法。

10

【請求項7】

MN/CA IXの検出または量が、乳房、尿路、腎臓、卵巣、子宮、膀胱、子宮頸部、子宮内膜、膣、口蓋垂、前立腺、肝臓、肺、皮膚、甲状腺、脾臓、精巣、脳、頭部および頸部、消化管、ならびに中胚葉の前癌性および癌性疾患より成る群から選択されるMN/CA IX抗原の異常発現に関連する前癌性および／または癌性疾患の存在または予後の指標となることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項8】

MN/CA IXの検出または量が、腎細胞癌、尿路前癌性および癌性疾患、乳癌、乳前癌、結腸直腸癌および結腸直腸前癌より成る群から選択される前癌性および／または癌性疾患の存在または予後の指標となることを特徴とする請求項1記載の方法。

20

【請求項9】

サンドイッチイムノアッセイを用いて、前記可溶性ヒトMN/CA IX抗原を検出または検出および定量することを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項10】

前記抗体がモノクローナル抗体であり、前記サンドイッチイムノアッセイに用いる1つのモノクローナル抗体がヒトMN/CA IX抗原の炭酸脱水酵素 (CA)ドメインに対する抗体であり、かつ前記サンドイッチイムノアッセイに用いる他のモノクローナル抗体がヒトMN/CA IX抗原のプロテオグリカン様(PG)ドメインに対するものであることを特徴とする請求項9記載の方法。

【請求項11】

30

前記CAドメインに対する抗体が、ブダペスト条約に基づき、ベルギーのヘント(Gent)にあるUniverseit GentのLaboratorium voor Moleculaire Biologie-Plasmidencollectie (LMBP)における Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)の国際寄託機関(IDA)に受託番号LMBP 6009CBとして寄託されたハイブリドーマ細胞株V/10-VUから分泌されるV/10モノクローナル抗体であり、かつ前記PGドメインに対する抗体が、米国バージニア州マナッサスのAmerican Type Culture Collection(ATCC)に、ATCC番号HB11128として寄託されたハイブリドーマ細胞株VU-M75によって分泌されるM75モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項10記載の方法。

【請求項12】

前記抗体および／または抗体断片が、MN/CA IX欠損マウスで作製されたMN/CA IX特異的モノクローナル抗体、およびMN/CA IXに特異的に結合するその抗体断片より成る群から選択されることを特徴とする請求項1記載の方法。

40

【請求項13】

HER-2外部ドメインに対して特異的な抗体および／またはHER-2外部ドメインに特異的に結合する抗体断片を用いて、前記体液中のHER-2外部ドメインを検出または検出および定量する工程をさらに含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項14】

前記体液が、HER-2タンパク質／ポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体またはHER-2タンパク質／ポリペプチドに特異的に結合する抗体断片を用いた治療に対する反応が不十分である癌患者由来のものであることを特徴とする請求項1記載の方法。

50

**【請求項 15】**

前記体液が癌患者由来のものであり、可溶性MN/CA IX抗原およびHER-2外部ドメインの両方が前記体液中に存在するか否かを特定することを含む請求項 13 記載の方法。

**【請求項 16】**

前記抗体の少なくとも 1 つがポリクローナル抗体であることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

**【請求項 17】**

前記抗体がモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を含むことを特徴とする請求項 1 記載の方法。

**【請求項 18】**

サンドイッチイムノアッセイに用いる抗体の少なくとも 1 つがポリクローナル抗体であることを特徴とする請求項 9 記載の方法。

**【請求項 19】**

サンドイッチイムノアッセイに用いる抗体はモノクローナル抗体とポリクローナル抗体であり、モノクローナル抗体がMN/CA IX抗原の炭酸脱水酵素 (CA) ドメインに対する抗体でありかつポリクローナル抗体がMN/CA IX抗原のプロテオグリカン様(PG)ドメインに対するものであるか、あるいはモノクローナル抗体がMN/CA IX抗原のプロテオグリカン様(PG)ドメインに対する抗体でありかつポリクローナル抗体がMN/CA IX抗原の炭酸脱水酵素 (CA) ドメインに対するものであることを特徴とする請求項 9 記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、遺伝医学の一般的分野および生化学工学、免疫化学、および腫瘍学の分野に属する。より具体的には本発明は、その遺伝子がMNタンパク質、MN/CA IXアイソザイム、MN/CA IX、炭酸脱水酵素IX、CA IX、またはMN/G250タンパク質としても現在知られる癌蛋白をコードする、MICA9、CA9、または炭酸脱水酵素9とも称される癌遺伝子であると考えられている細胞遺伝子である、MN遺伝子に関する。

**【0002】**

より具体的には、本発明はMN/CA IX-欠損マウス(ノックアウトマウス)で作製された新規のMN/CA IX特異的抗体、およびこれらの新規抗体の使用に関する。注目すべきことに、新規MN/CA IX-特異的抗体の一部、好ましくはモノクローナル抗体およびその免疫反応性断片は、CA IXタンパク質およびポリペプチド上の非免疫優性エピトープに対するものであり、そのような抗体および免疫反応性断片は、多数の診断/予後診断および治療的用途の中でも、MN/CA IX抗原、特に体液中に見られる可溶性MN/CA IX抗原(s-CA IX)を検出するための高度に特異的な二抗体サンドイッチアッセイで有用である。

**【0003】**

本発明はまた、可溶性MN/CA IX抗原(s-CA IX)自体、およびそれを検出しまたは検出および定量するための分析法に関する。さらに本発明は、CA IXとHER-2/neu/c-erbB-2("HER-2")の同時発現、ならびにHER-2を標的とした方法に平行しておよび/または代替として行う診断/予後診断および治療的方法に関する。特に好ましいのは、癌患者由来の同一体液試料中の、HER-2外部ドメイン("p100")およびCA IX細胞外ドメイン(50/54キロダルトン)の両方を検出するための分析法である。CA IXを標的とする予備的な治療的方法を、HER-2治療に感受性のない患者に用いることができる。HER-2およびCA IXを標的として用いた、そのような一体化した診断/予後診断および治療的方法は、臨床医に、転移性乳癌患者のような癌患者を助けるためのより包括的な手段を提供することができる。

**【背景技術】****【0004】**

上記で示したように、MN遺伝子およびタンパク質はいくつかの別名で知られ、その名称は本明細書において互換的に用いられる。MNタンパク質は亜鉛と結合し、炭酸脱水酵素(CA)活性を有することが見出され、現在は、第9番目の炭酸脱水酵素アイソザイム-MN/CA I

10

20

30

40

50

XまたはCA IXと考えられている (Opavsky et al. 1996)。炭酸脱水酵素命名法によると、ヒトCAアイソザイムは大文字活字体とローマ数字とで表記され、一方、その遺伝子は斜体およびアラビア数字で記載される。あるいは、"MN"はここでは炭酸脱水酵素アイソザイムIX(CA IX)タンパク質/ポリペプチド、または炭酸脱水酵素アイソザイム9(CA9)遺伝子、核酸、cDNA、mRNAなどを文脈によって示される通りに指すように用いられる。

【 0 0 0 5 】

MNタンパク質はG250抗原を用いて同定されている。非特許文献1は、「配列解析およびデータベース検索によって、G250抗原は、子宮頸癌(Pastorek et al., 1994)中で同定されたヒト腫瘍関連抗原であるMNと同一であることが示された」と述べている。

【 0 0 0 6 】

CA IXは、非特許文献2に最初に記載されたM75モノクローナル抗体を用いて、Zavada, Pastorekova, Pastorek (特許文献1)によって同定された癌関連炭酸脱水酵素である。その抗体は、腫瘍および正常組織中のCA IX発現の評価(非特許文献3および他文献多数)において、CA IXをコードするcDNAのクローニング(非特許文献4)において、細胞密度によるCA IX調節の研究(非特許文献5および6)において、ならびに低酸素によるCA IX誘導の実証(非特許文献7および他文献多数)において、使用された。これらの研究すべてが、最初の特許文献1でなされた、CA IXは新生物発生前/新生物性腫瘍マーカーとして診断的および/または予後診断的に、ならびに標的として治療的に用いることができるという仮定を支持し、また、M75モノクローナル抗体が免疫検出法および免疫ターゲティング手法について有用である価値のあるCA IX-特異的試薬であることを示した。

【 0 0 0 7 】

特許文献2 (Zavada et al., 1993年9月16日公開)および特許文献3 (1995年2月7日発行)は、MN遺伝子およびタンパク質の発見ならびにその生物学および分子的性質について記載している。MN遺伝子は試験したすべての脊椎動物の染色体DNA中に存在すること、およびその発現は腫瘍原性と強く相関することが見出された。

【 0 0 0 8 】

MNタンパク質は、ヒト子宮頸部癌由来のHeLa細胞で最初に同定された。それは、多数のタイプのヒト癌(特に、中でも子宮頸癌、卵巣癌、子宮内膜癌、腎癌、膀胱癌、乳癌、直腸結腸癌、肺癌、食道癌、および前立腺癌)で見つかる。MNタンパク質を顕著に発現することが見出されている正常組織は非常に少ない。これらのMNを発現している正常組織は、ヒト胃粘膜および胆のう上皮、および消化管の他の正常組織の一部を含む。逆説的に、MN遺伝子発現は、たとえば胃粘膜のような通常MNを発現する組織では、癌および他の新生物発生前/新生物性疾患では失われるかまたは低下することが見出されている。

【 0 0 0 9 】

一般に、癌遺伝子はMNタンパク質の異常な発現によって表すことができる。たとえば、癌遺伝子は：(1)MNタンパク質が、通常はMNタンパク質を顕著には発現しない組織中に存在する場合；(2)MNタンパク質が、通常はそれを発現する組織に存在しない場合；(3)MN遺伝子発現が、ある組織中で通常発現されるよりも有意に上昇したレベル、または有意に低下したレベルである場合；または(4)MNタンパク質が細胞内の異常な部位で発現されている場合、によって表すことができる。

【 0 0 1 0 】

特許文献2 (Zavada et al.) および特許文献4 (Zavada et al., 1995年12月21日公開)は、MN遺伝子およびタンパク質の発見、およびMN遺伝子発現と腫瘍原性との強い関連が、癌および前癌状態の診断/予後診断および治療の両方の方法の開発にどのように結びつくかを開示する。脊椎動物における異常なMN遺伝子発現を検出、または検出および定量することによって、新生物性疾患の発症および存在を特定するための方法および組成物が提供された。異常なMN遺伝子発現は、脊椎動物試料におけるさまざまな従来の方法によって、たとえば、MN抗原を検出、または検出および定量するためのMN-特異的抗体を用いるイムノアッセイによって、ハイブリダイゼーション分析によって、あるいはMNmRNAのようなMN核酸を検出、または検出および定量するための、MNCdNA等のMN核酸を用いるRT-PCR等の

10

20

30

40

50

PCR分析によって、検出、または検出および定量することができる。

【0011】

MN/CA IX は、ウェスタンブロッティングによる推定では、見かけの分子量が58 および 54 キロダルトン (kDa) の、細胞膜タンパク質および核タンパク質の両方として、ヒト子宮頸部癌由来のHeLa 細胞で最初に同定された。MN/CA IX は3kDaの一本鎖糖鎖によってN-グリコシル化されており、非還元条件下でS-S結合オリゴマーを形成する(非特許文献 8 および 4)。MN/CA IXは細胞表面に位置する膜貫通タンパク質であるが、一部では、核で検出されている(非特許文献 3 および 4、前出)。

【0012】

MNは、HeLa細胞では対タンパク質p54/58Nとして発現する。p54/58N(MAbM75)と反応するモノクローナル抗体を用いたイムノブロットでは、54kdおよび58kdに2本のバンドが現れた。これらの2本のバンドは、おそらく翻訳後修飾によって異なるタンパク質の一つの型に対応するであろう。

【0013】

特許文献 2 (Zavada et al.) および / または特許文献 4 は、図1A-1Cに示すMNcDNA配列(配列番号1)、同じく図1A-1Cに示すMNアミノ酸配列(配列番号2)、および図2A-2Fに示すMNゲノム配列(配列番号3)について開示する。MN遺伝子は、11個のエキソンおよび10個のイントロンで構成されている。配列番号1のヒトMNcDNA配列は、1522塩基対(bp)を含む。配列番号70のMNcDNA配列は1552bpを含む(EMBL受託番号X66839;Pastorek et al.(1994))。

【0014】

図1A-1C(配列番号2)に示すMNタンパク質の最初の37個のアミノ酸は、推定されるMNシグナルペプチド(配列番号4)である。MNタンパク質は細胞外(EC)ドメイン(図1A-1C(配列番号5)のアミノ酸(aa)38-414)、膜貫通(TM)ドメイン(aa415-434(配列番号6))、および細胞内(IC)ドメイン(aa435-459(配列番号7))を有する。細胞外ドメインは、アミノ酸(aa)53-111(配列番号8)付近、または好ましくはaa52-125(配列番号98)付近にプロテオグリカン様(PG)ドメイン、およびaa135-391(配列番号9)付近、または好ましくはaa121-397(配列番号101)付近に炭酸脱水酵素(CA)ドメインを含む。

【0015】

特許文献 2 および 4 (Zavada et al.) は、MN-特異的抗体の作製について説明する。代表的で好ましいMN-特異的抗体であるモノクローナル抗体M75(MabM75)は、米国バージニア州マナッサスのAmerican Type Culture Collection(ATCC)に、ATCC番号HB11128として寄託された。M75抗体は、MNタンパク質を発見および同定するのに用いられ、また、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、および免疫組織化学的分析において、たとえば、新鮮な、凍結した、あるいはホルマリン、アルコール、アセトン等で固定したおよび / またはパラフィン包埋および脱パラフィンした組織試料で、容易にMN抗原を同定するのに用いることができる。もう一つの代表的で好ましいMN-特異的抗体であるMabMN12は、ATCCに登録番号HB11647として寄託されたハイブリドーマMN12.2.2によって分泌される。特許文献 4 (Zavada et al.) の実施例 1 は、MabM75を用いた組織の免疫組織化学染色からの代表的結果を示し、その結果は、MN遺伝子を癌遺伝子とすることを支持する。

【0016】

免疫優性エピトープは、本質的にMN/CA IXのPGドメイン内に存在すると考えられており、M75mabに対する反復エピトープ、特にN末端PG領域で4回同一に反復する(Zavada et al. 2000)アミノ酸配列PGEEDLP(配列番号11)を含む。MN12mabに対するエピトープもまた免疫優性である。

【0017】

M75 mabは、非特許文献 2 で最初に報告され、具体的かつ一般的に、すべてのMN/CA IX-特異的抗体(ポリクローナルおよびモノクローナルならびにその断片を含む)と共に、たとえば、特許文献 5 (Zavada et al.) および特許分権 6 を含む、いくつかの米国特許および外国特許でクレームされている。(特許文献 1、特許文献 7 から 21 (Zavada et al.) も参照。) これらのZavada et al. の米国特許および外国特許は参照によって本開示

10

20

30

40

50

に含まれる。

【0018】

CA IXは、二酸化炭素と炭酸水素イオンとの間の可逆的変換を触媒する、亜鉛金属酵素の炭酸脱水酵素ファミリーの活性の高いメンバーである (Pastorek et al. (1994); Opavsky et al. (1996); Chegwidden et al. (2000); Wingo et al. (2001))。これは、細胞質(CA I、II、III、VII)、ミトコンドリア(CAVA、VB)、分泌顆粒(CAVI)、および細胞膜(CA IV、IX、XII、XIV)を含む異なる細胞内の位置を占める、哺乳類に存在する14種類のアイソフォームの一つである。アイソザイムの一部は幅広い組織に分布し(CA I、II、CAIV)、他のものは特定の器官により限られていて(唾液腺のCAVI)、2種類のアイソフォームは癌組織と結びつけられている(CA IX、XII) (Chegwidden(2000)、Pastorek and Pastorekova (2003)に総説)。酵素活性および動力学的性質、およびスルホンアミド阻害剤に対する感受性は、高いもの(CA II、CA IX、CA XII、CA IV)から低いもの(CA III)までさまざまである (Supuran and Scozzafava (2000))。CA関連タンパク質とされたいくつかのアイソフォーム(CA-RP VII、X、XI)は、不完全に保存された活性部位が原因で触媒性である。タンパク質の同一のファミリーの遺伝子的に関係のあるメンバー間でのこの稀な変動性は、さまざまな生理的および病因的過程にそれらが用いられることの基礎となる。触媒活性は、代謝的に活性な組織における酸塩基平衡およびイオンと水の交換の維持の根本に関わっている。この活性を介して、CAは、呼吸、体液の産生(硝子体液、胃液、脳脊髄液)、骨再吸収、腎酸性化などにかなり寄与する(Chegwidden 2000)。

【0019】

CA IXアイソザイムはいくつかの性質を併せ持ち、そのことがCA IXアイソザイムを基礎研究および臨床研究の重要な対象としている。第一に、CA IXの発現は、幅広いヒト腫瘍に非常に密に関連しているが、対応する正常組織には通常存在しない (Zavada et al. (1993); Liao et al. (1994); Turner et al., 1997; Liao et al., 1997; Saarnio et al., 1998; Vermylen et al., 1999; Ivanov et al. (2001); Bartosova et al. (2002))。これは主に、CA9プロモーター中の転写開始部位のすぐ上流に位置する低酸素応答配列に結合する低酸素誘導性転写因子を介して、CA9遺伝子の転写を強力に活性化する腫瘍低酸素に関係している (Wykoff et al. (2000))。腫瘍低酸素は、癌の発生および治療にとって劇的な意味を有する重要な現象であるため (Hockel and Vaupel (2001))、CA IXは、予後診断的/予知的価値を持つ内因性の低酸素マーカーとして、および将来性のある治療標的として、重大な可能性を有する (Wykoff et al. (2000); Wykoff et al. (2001); Beasley et al. (2001); Giatromanolaki et al. (2001); Koukourakis et al. (2001))。その臨床応用に有利であることに、CA IXは細胞膜貫通タンパク質であって癌細胞の表面で露出した大きな細胞外部分を有し、したがって特異的モノクローナル抗体を含むターゲティング手法によって利用可能である。さらに、CA IXは、細胞外CAドメインのN末端伸長部分を形成し、他のアイソザイムとの交差認識の排除を可能にする独自のプロテオグリカン関連領域(PG)の存在によって他のCAアイソザイムと異なる (Opavsky et al. (1996))。さらに、CA IXは細胞接着に機能的に関係するとされており、また高い触媒活性のために、細胞外微小環境の酸性化に寄与することが提唱されている (Zavada et al. (2000); Ivanov et al., (1998))。したがって、その機能を失わせるためにCA IXタンパク質を標的にすることは、治療効果を有すると予測される。CA IXの臨床利用の可能性に加えて、CA IXの多数の分子のおよび機能的側面を明らかにすることにますます関心が持たれており、それは、癌細胞における正確な役割に関して、および異なるドメイン/配列モチーフの寄与に関して、およびその調節に関しての知識がまだ断片的であるためである。

【0020】

これまでのところ、CA IX関連の基礎研究の大部分は、CA IXのN末端PG領域を認識する単一のマウスモノクローナル抗体M75を用いて実施された (Pastorekova (1992)、Zavada (2000))。この抗体は高度に特異的であり、かつ癌組織切片の免疫組織化学分析 (Liao et al. (1994); Ivanov et al. (2001)およびその参考文献)、動物モデルにおける低酸素性腫瘍細胞のターゲティング (Chrastina et al. (2003))、in vitroのCA IX免疫検

10

20

30

40

50

出、および分子的特徴づけ (Pastorek et al. (1994); Lieskovska et al. (1999); Kaluz et al. (1999); Kaluz et al. (2002)、Olive et al. (2001))を含む特定の目的に非常に適していることが証明された。

【特許文献 1】米国特許第5,387,676号明細書

【特許文献 2】国際公開第93/18152号パンフレット

【特許文献 3】米国特許第5,387,676号明細書

【特許文献 4】国際公開第95/34650号パンフレット

【特許文献 5】米国特許第5,981,711号明細書

【特許文献 6】欧州特許第0 637 336号明細書

【特許文献 7】米国特許第5,955,075号明細書

10

【特許文献 8】米国特許第5,972,353号明細書

【特許文献 9】米国特許第5,989,838号明細書

【特許文献 10】米国特許第6,004,535号明細書

【特許文献 11】米国特許第6,051,226号明細書

【特許文献 12】米国特許第6,069,242号明細書

【特許文献 13】米国特許第6,093,548号明細書

【特許文献 14】米国特許第6,204,370号明細書

【特許文献 15】米国特許第6,204,887号明細書

【特許文献 16】米国特許第6,297,041号明細書

【特許文献 17】米国特許第6,297,051号明細書

20

【特許文献 18】オーストラリア特許第669694号明細書

【特許文献 19】カナダ特許第2,131,826号明細書

【特許文献 20】独国特許出願公開第69325577.3号明細書

【特許文献 21】韓国特許第282284号明細書

【非特許文献 1】Uemura et al., "Expression of Tumor-Associated Antigen MN/G250 in Urologic Carcinoma: Potential Therapeutic Target," J. Urol., 154 (4 Suppl.): 377 (Abstract 1475; 1997)

【非特許文献 2】Pastorekova et al. Virology 187: 620-626 (1992)

【非特許文献 3】Zavada et al., Int J Cancer. 54: 268-274, (1993)

【非特許文献 4】Pastorek et al., Oncoene, 9: 2788-2888 (1994)、

30

【非特許文献 5】Lieskovska et al., Neoplasma, 46: 17-24, (1999)

【非特許文献 6】Kaluz et al., Cancer Research, 62: 4469-4477, (2002)

【非特許文献 7】Wykoff et al., Cancer Research, 60: 7075-7083 (2000)

【非特許文献 8】Pastorekova et al., Virology, 187: 620-626 (1992)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0021】

一方、捕捉 - 検出の原理に基づく手法のため、またはCA IXの突然変異体の研究のために、M75とは異なるエピトープ特異性を有するCA IX-特異的モノクローナル抗体はこれまでは入手可能になっていない。そのような抗体を作製するには、以前は多数の重大な障害があった。本発明は、CA IXの非免疫優性エピトープに対する抗体を作製する方法に関連する問題を解決し、そのような抗体のさまざまな臨床的および実験的使用を開示する。

40

【課題を解決するための手段】

【0022】

一つの態様では、本発明は、CA IX-欠損マウスで作製された新規のCA IX-特異的抗体、特にCA IX細胞外ドメイン上の非免疫優性エピトープに対するモノクローナル抗体およびその免疫反応性断片に関する。実施例2に記載の通り、CA IX-欠損マウスで作製された代表的CA IX-特異的抗体は、V/10-VUによって産生されたV/10mabであり、そのハイブリドーマは2003年2月19日にブダペスト条約に基づき、ベルギーのヘント (Gent) にあるBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) (ベルギー微生物保存機関) のLab

50

oratorium Voor Moleculaire Biologie-Plasmidencollectie (LMBP)に寄託された。

【0023】

ここで具体的に詳述するプロトコールに照らして、CA IX-欠損マウスで作製されたCA IX-特異的抗体は、PGまたはCAドメインに対するものであり、当業者はここに詳述されたものと類似の方法は単独で、または当該分野で既知である従来の方と組み合わせて、たとえば、TMまたはICドメインといった図4に示すCA IXの他のドメインに対する、CA IX-特異的抗体または免疫反応性抗体断片を作製するのに用いることができることを理解する。

【0024】

別の態様では、CA IX-欠損マウスで作製された新規のCA IX-特異的抗体、特にCA IXの免疫優性エピトープに対する抗体でないモノクローナル抗体およびその免疫反応性断片を、前癌および癌(新生物発生前/新生物性疾患)を検出するために臨床的・診断的および/または予後診断的に、ならびに前癌および癌(新生物発生前/新生物性疾患)を治療するのに治療的に用いることができる。CA IX-欠損マウスで作製された、非免疫優性エピトープに対する新規のCA IX-特異的抗体は、診断的/予後診断的、または治療的に、単独で、またはM75モノクローナル抗体のようなCA IX-欠損マウスで作製されていないCA IX-特異的抗体と組み合わせて用いることができる。CA IXのPGドメイン以外に対する本発明の抗体は、PGドメインに対するCA IX-特異的抗体を用いて体液中に認められるCA IX抗原の可溶型(s-CA IX)を検出するのに特に有用である。好ましくはそのような分析はPGおよびCAドメインに対するCA IX-特異的抗体を含むが、任意の他のドメインに対するCA IX-特異的抗体と組み合わせるか、あるいはCA IX-特異的抗体が互いの結合を立体的に妨害または阻害する同一の、重複するおよび/または近接するエピトープを有しない限り、たとえばICまたはTMといった他のドメインに対するCA IX-特異的抗体もそのような分析に適当であろう。異なるMN標の抗原についての分析法を最適化することは当該分野の技術範囲である。本発明のCA IX-特異的抗体を用いる二重抗体サンドイッチ法は、体液中のCA IX(s-CA IX)の可溶型を検出するかまたは検出および定量する診断/予後診断分析法に特に好ましい。

【0025】

CA IX-欠損マウスで作製されたCA IX-特異的抗体、特にCA IXの免疫優性エピトープに対するものでない抗体は、単独で、またはそのようなCA IX-特異的抗体またはM75モノクローナル抗体のような免疫優性エピトープに対するCA IX-特異的抗体と組み合わせて、CA IXタンパク質のさまざまな欠失変異体を検出するかまたは検出および定量するのに用いることができる。

【0026】

CA IX-欠損マウスで作製されたCA IX-特異的抗体、特にCA IXの非免疫優性エピトープに対するものは、個別にまたは他のそのようなCA IX-特異的抗体と組み合わせて、癌研究、前癌/癌の診断/予後診断、癌治療の決定を行う際、新しい形の癌治療の開発、および抗腫瘍ワクチンに用いることができる。たとえば、CA IX-欠損マウスで作製された、CA IXのたとえばCA、TM、またはICドメインといったさまざまなドメインに対するCA IX-特異的抗体は、CA IXの欠失変異体を検出するおよび/または同定するのに用いることができる。さらにとりわけ、たとえば、CA IX-欠損マウスで作製されたCA IX-特異的抗体、特に免疫優性エピトープに対するものでない抗体は、単独でまたはCA IX-特異的抗体と組み合わせて、さまざまな用途に用いることができ、中でも下記のような用途がある。

【0027】

a) 基礎および前臨床研究

- ・ CA IX分子における構造 - 機能関係の研究;
- ・ 癌細胞からの可溶性CA IXの放出の機構の研究、CA IXの生物学的活性の測定、および病因生理的側面の可能性の探索;
- ・ CA IXの上流および下流のシグナル伝達経路の研究;
- ・ 腫瘍増殖および代謝におけるCA IXの役割の研究;
- ・ 薬剤、放射線、阻害剤などによる治療への応答におけるCA IXの役割の研究;

b) 癌スクリーニング、検出、診断および予後診断

10

20

30

40

50



- ・腫瘍診断、治療結果の予測および疾患発症の予後診断のための、腫瘍標本中でのCA IX(およびその推定変異体)の検出;
- ・体液中の可溶性CA IXの検出のための高感度試験の開発;
- ・CA IX検出に基づくスクリーニング手法の開発、および治療後の癌再発または転移の監視;
- ・腫瘍および転移の画像化法;

#### c)腫瘍治療

- ・治療目的のためのヒト化抗体、一本鎖断片、組み換え二重特異性抗体、ミニ抗体、二重特異性抗体、および他の形の抗体の調製;
- ・癌拡大および/または 進行を防ぐための、CA IX 活性を阻害することによるかまたは 10  
抗体依存性細胞障害によるか、または補体媒介細胞障害による、非複合体型抗体を基礎とする治療;
- ・細胞障害性T細胞による腫瘍細胞溶解を狙った、二重特異性抗体を基礎とする治療 ;
- ・薬物前駆体を活性な抗癌剤に変換する酵素と結合した抗体による治療;放射性同位体と結合した抗体による放射線免疫治療;
- ・毒素と結合した抗体による治療;
- ・化学治療薬と結合した抗体による治療;
- ・治療効果を高めるため、従来の治療薬(または癌関連経路のさまざまな阻害剤)、生体内還元薬、または放射線治療と組み合わせた抗体による治療;
- ・抗体を他の癌関連 抗原、またはサイトカインと組み合わせた治療; 20
- ・ターゲティング送達のためにプラスミド/ベクター結合抗体を用いた遺伝子治療;

#### d)抗腫瘍ワクチン接種

- ・ワクチンとしての用途のため、CA IX の内部画像を用いた抗イディオタイプ抗体の作製。

#### 【 0 0 2 8 】

脊椎動物の体液、好ましくは哺乳類の体液、より好ましくはヒト体液中に見出される可溶性CA IX(s-CA IX)は、約10キログルトン(kd)から約65kdまで、好ましくは約15kdから約54kdまで、より好ましくは約20kdから約54kdまでの分子量を有する;さらにより好ましくは前記s-CA IXは、約15kdから約35kdまでかまたは約45kdから約54kdまでのいずれか、より好ましくは約20kdから約30kdまでかまたは約50kdから約54kdまでのいずれかの分子量を有し、非常に好ましくは前記s-CA IXは主に、ウェスタンブロッティングからの概算では約50/54kdの分子量を有する対タンパク質としての分子量を有する。 30

#### 【 0 0 2 9 】

体液中およびたとえばHT29といった腫瘍細胞株の培地中に見出されるs-CA IXは、ウェスタンブロット上では主に50/54kdの2本のバンドとして見られる。CA IXのもう一方の主要な型は、ウェスタンブロット上で54/58kdの2本のバンドとして見られる、細胞に結合した膜貫通タンパク質である。体液中および組織培養(TC)培地中に見出されるs-CA IXは、膜貫通(TM)および細胞内(IC)ドメインのタンパク質分解切断によって放出された、CA IXの細胞外部分であると考えられている。s-CA IXはウェスタンブロット上では主に50/54kdの2本のバンドであり、プロテオグリカン様(PG)ドメインおよび炭酸脱水酵素(CAドメイン(図4参照)から成る、CA IXの細胞外部分だけに相当すると考えられている。完全な細胞結合CA IXは、ウェスタンブロット上では主に54/58kdの2本のバンドであり、さらに膜貫通(TM)領域および細胞内(IC)アンカーを含む。 40

#### 【 0 0 3 0 】

s-CA IXはまた、好ましくは20-30kdの、他より小さい形としても存在し、これはCAドメインまたはその一部から成ると考えられる。約62kdの、s-CA IXのより大きな分子量種が癌患者の体液中に見つかっているが、CA IX細胞外(EC)ドメインの理論的分子量は約50/54kdであることに照らし、そのような種は稀でおそらく異常であり、他の分子種と結合していると考えられている。

#### 【 0 0 3 1 】

s-CA IXは多数のさまざまな癌の診断 / 予後診断マーカーであると考えられている。s-CA IXの好ましい診断 / 予後診断用途は、腫瘍の外科的除去後の患者を監視すること、および治療のための最適な方法について決断を行うことであると考えられている。本発明の非免疫優性エピトープに対するCA IX-特異的抗体は、単独で、またはM75mabまたはV/18mabのもののような免疫優性エピトープに対するCA IX-特異的抗体と組み合わせて、体液中で低濃度であるs-CA IXのすべての型を検出するのに重要であると考えられている。

#### 【 0 0 3 2 】

MN抗原をたとえばウェスタンブロッティングまたはラジオイムノアッセイによって分析するのに好ましい試料は、組織および / または細胞抽出物である。しかし、MN抗原は、特に可溶型では、細胞外ドメインとして、体液中に検出することができ、体液はとりわけ下記を含むことができる:血液、血清、血漿、精液、乳房分泌物、胃分泌物、糞便懸濁液、胆汁、唾液、涙液、痰、粘液、尿、リンパ液、細胞質ゾル、腹水、胸水、羊水、膀胱洗液、気管支肺胞洗浄液および脳脊髄液。MN抗原は試験の前により大きい量の体液から濃縮することが好ましい。分析するのに好ましい体液は、検査する癌の型によって決まるが、一般的に好ましい体液は、尿、血清、糞便懸濁液、粘液、胃分泌液、胆汁、乳房分泌物、胸水、および腹水である。

#### 【 0 0 3 3 】

脊椎動物の、好ましくは哺乳類の、より好ましくはヒトの体液中のs-CA IXを検出するために好ましいイムノアッセイ型式は、CA IXの異なる領域に対するCA IX-特異的抗体を用いた二抗体サンドイッチアッセイである。

#### 【 0 0 3 4 】

検出することができるかまたは検出および定量することができるs-CA IXに対して、CA IXのECドメイン、好ましくはPGまたはCAドメイン (それぞれM75mabまたはV/10mabが結合するような) に特異的なCA IX-特異的抗体が結合することができる。約20から約30kdの分子量を有する、s-CA IXの小さいほうの型は、PGドメインを欠くと考えられ、そのためその型は好ましくはCAドメインに対する、好ましくはそのドメイン上で相当隔たっているエピトープに対するCA IX-特異的抗体で検出および定量され、その隔たりは、完全長CA IXまたはそのECドメインとは異なるエピトープの立体構造的性質およびタンパク質 / ポリペプチド3次元構造に依存する。

#### 【 0 0 3 5 】

哺乳類体液中のs-CA IXタンパク質 / ポリペプチドを検出するかまたは検出および定量する一つの方法は、

(a) CA IXタンパク質または少なくとも16アミノ酸から成るCA IXポリペプチドに特異的に結合する一種類以上の抗体と前記試料とを接触させる;および

(b)前記試料中における前記抗体の結合を検出するかまたは検出および定量する、工程を含む。そのような方法では、一種類以上の前記CA IX-特異的抗体は標識されている。そのような方法は、たとえば、ウェスタンブロット、酵素結合免疫吸着法、ラジオイムノアッセイ、競合イムノアッセイ、二抗体サンドイッチ法、免疫組織化学染色法、凝集法、および蛍光イムノアッセイといった標準的形式で用いることができる。そのような方法は、CA IXタンパク質の異常な発現を伴い、かつ乳房、尿路、腎臓、卵巣、子宮、膀胱、子宮頸部、子宮内膜、膣、口蓋垂、前立腺、肝臓、肺、皮膚、甲状腺、脾臓、精巣、脳、頭部および頸部、消化管、ならびに中胚葉の前癌性および癌性疾患より成る群から選択される癌性または前癌性疾患の診断および / または予後診断であってよい。

#### 【 0 0 3 6 】

そのような方法は特に、乳房、大腸、直腸、ならびに腎臓、膀胱、尿道といった尿路の癌性または前癌性疾患に対するものであってよい。腎細胞癌(RCC)および転移性乳癌、およびそれに結びつく前癌は、体液中のs-CA IXを検出するかまたは検出および定量する診断 / 予後診断分析法の特段の標的と考えられている。

#### 【 0 0 3 7 】

本発明の別の一態様は、前癌および癌におけるCA IXとHER-2/neu/c-erbB-2("HER-2")の

同時発現に関する。下記の実施例11で報告されるように、二つの遺伝子の発現に有意な相関が観察されている。トラスツズマブすなわちハーセプチンは、HER-2に対するヒト化mabであり、HER-2陽性癌、特に乳癌、さらにとりわけ転移性乳癌の治療に用いられる (Horton, M. B., Cancer Control, 9 (6): 499-507(2002))。ハーセプチンは単独で患者に投与することができるが、いくつかの化学治療薬の有効性を高めることができる。しかし、HER-2陽性癌のうち相当な割合がハーセプチンに反応しない (Kuter, 1. (2001))。癌患者をHER-2およびMN/CA IXの両方の発現について検査し、臨床的視野、治療的手段およびもっとも見込みのある治療結果のための最適な治療の組み合わせを選択するための診断/予後診断パラメータを拡大することは有益である。

【0038】

10

ここで説明する通り、CA IXは低酸素マーカーと考えられており、低酸素は放射線抵抗性を示し、また化学治療がどのように進行するかを示す。たとえば、ブレオマイシンのような薬剤は、毒性であるためには絶対的に酸素を要求する。臨床医が化学治療薬を選択するかまたは、ハーセプチンのような他の様式と共に放射線を用いるかどうか決断する場合、腫瘍細胞が低酸素性条件を示すCA IXを発現しているかどうかは治療的決断の要因であるべきである。

【0039】

ここではまた、CA IX発現細胞を標的とするための治療的方法が開示される。抗体、好ましくはmabs、しばしば好ましくは、免疫反応性抗体断片は、他の変異体の中でも二重特異性、キメラ、ヒト化変異体、細胞内発現抗体もまた、単独で、または毒性物質と結合して、用いることができる。さらにCA阻害剤は臨床医に別の選択肢を提供する。

20

【0040】

特に重要なのは、外部ドメイン("p100")を体液中に脱落させるHER-2についての分析と類似した(たとえば、米国特許第5,401,638号 (Carney et al.) を参照)、s-CA IXについての分析である。そのような試験は、同一の自動化系による検出のために選択することができる標識を用いて、同じ患者体液試料においてでも実施することができる。

【0041】

そこで、一つの態様では、本発明は、特に乳癌患者由来の患者体液中のs-CA IXおよびHER-2外部ドメインを連続的にまたは同時に検出するかまたは検出および定量する方法に関する。別の態様では、本発明は、HER-2陽性であるがハーセプチンに反応しない癌患者特に乳癌患者の体液を検査すること、および、CA IX陽性である部分集合を、CA IX-特異的抗体、好ましくはmabsまたはその断片または、好ましくは完全ヒト化した、単独の、または毒素または代替としてCA阻害剤と結合した適当な抗体変異体を用いて、またはたとえば適当な化学治療薬および一部の場合には放射線を含む、合理的に選択された従来の治療法と組み合わせてそのようなCA IX-特異的抗体および/またはCA阻害剤を用いて、その部分集合を治療することに関する。

30

【0042】

#### 略語

本明細書中では下記の略語が用いられる：

5-FC-5-フルオロシトシン

40

5-FU-5-フルオロウラシル

<sup>a</sup> 予想標的ドメイン

aa-アミノ酸

ATCC-American Type Culture Collection

bp-塩基対

BLV-ウシ白血病毒

BSA-ウシ血清アルブミン

BRL-Bethesda Research Laboratories

CA-遺伝子導入 MDCK 細胞で発現された、CAドメインを欠くMN/CA IX タンパク質の欠失変異体

50

CA-炭酸脱水酵素	
CAM-細胞 接着 分子	
CARP-炭酸脱水酵素 関連タンパク質	
CAT-クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ	
Ci-キュリー	
CIS-in situ癌	
cm-センチメートル	
CMV-サイトメガロウイルス	
cpm-毎分回	
C-末端-カルボキシル-末端	10
CTL-細胞障害性 Tリンパ球	
C-セ氏	
DEAE-ジエチルアミノエチル	
DMEM-ダルベッコ改変イーグル培地	
ds-二本鎖	
EDTA-エチレンジアミン四酢酸	
EGF-上皮増殖因子	
EIA-酵素イムノアッセイ	
ELISA-酵素結合免疫吸着法	
EMSA-電気泳動移動度シフト法	20
EPO-エリスロポエチン	
ER-エストロゲン受容体	
ex-細胞抽出物中の抗原	
F-線維芽細胞	
FACS-フローサイトメトリー試験	
FCS-ウシ胎児血清	
FITC-フルオレセインイソチオシアネート	
f1-野生型cDNAを安定に遺伝子導入したMDCK(Madin Darby Canine Kidney)イヌ腎上皮細胞 で発現した完全長MN/CA IX	
FTP-DNase 1 フットプリンティング分析	30
GST-MN-融合タンパク質 MNグルタチオンS-トランスフェラーゼ	
GVC-ガンシクロビル	
H-HeLa細胞	
HBS-HIF-結合部位	
H-E-ヘマトキシリン-エオシン	
HEF-ヒト胚線維芽細胞	
HeLa K- HeLa 細胞の標準型	
HeLa S-Stanbridgeの突然変異株HeLa D98/AH. 2	
H/F-T-腫瘍形成性のハイブリッドHeLa 線維芽細胞;HeLa D98/AH. 2 に由来	
H/F-N-非腫瘍形成性のハイブリッド HeLa 線維芽細胞; HeLa D98/AH. 2 に由来	40
HIF-低酸素誘導性因子	
HPV-ヒトパピローマウイルス	
HRE-低酸素応答配列	
HRP-西洋ワサビペルオキシダーゼ	
HSV-単純ヘルペスウイルス	
IC-細胞質内のまたは細胞内の	
IF-免疫蛍光	
IFN-インターフェロン	
IHC-免疫組織化学	
IL-2-インターロイキン-2	50

Inr-イニシエーター	
IP-プロテインAセファロースを用いた免疫沈降	
IPTG-イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド	
kb-キロ塩基	
kbp-キロ塩基対	
kdまたはkDa-キロダルトン	
KS-ケラタン硫酸	
KLH-スカシ貝ヘモシアニン	
LCMV-リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス	
LTR-長い末端反復	10
M-モル	
mA-ミリアンペア	
Mabまたはmab-モノクローナル抗体	
MCSF-マクロファージコロニー刺激因子	
ME-メルカプトエタノール	
MEM-最小必須培地	
min.-分	
mg-ミリグラム	
ml-ミリリットル	
mM-ミリモル	20
MMC-マイトマイシンC	
mmol-ミリモル	
MLV-マウス白血病ウイルス	
N-正常濃度	
ND-実施せず	
NEG-陰性	
ng-ナノグラム	
nm-ナノメートル	
nt-ヌクレオチド	
N-末端-アミノ末端	30
ODN-オリゴデオキシヌクレオチド	
ORF-オープンリーディングフレーム	
PA-プロテインA	
PBS-リン酸緩衝生理食塩水	
PCR-ポリメラーゼ連鎖反応	
PEST-プロリン、グルタミン酸、セリン、スレオニンの一文字略号の組み合わせ	
PG-プロテオグリカン様領域	
PGK-ホスホグリセリン酸キナーゼ	
pI-等電点	
PMA-ホルボール12-ミリスチン酸13-酢酸	40
POS陽性	
Py-ピリミジン	
RACE-cDNA末端の迅速増幅	
RCC-腎細胞癌	
RIA-ラジオイムノアッセイ	
RIP-放射免疫沈降	
RIPA-放射免疫沈降分析	
RNP-RNase保護分析	
RT-PCR-逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応	
SAC-黄色ブドウ球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> ) 細胞	50

S. aureus-Staphylococcus aureus

sc-皮下

SDRE-血清用量応答配列

SDS-ドデシル硫酸ナトリウム

SDS-PAGE-デシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SINE-短い散在反復配列

SP-シグナル ペプチド

SP-RIA-固相ラジオイムノアッセイ

SSDS-合成スプライドナー部位

SSH-差分抑制PCR

SSPE-NaCl (0.18 M)、リン酸ナトリウム (0.01M)、EDTA (0.001M)

SV40-シミアンウイルス40

TBE-Tris-ホウ酸/EDTA電気泳動緩衝液

TC-組織培養

TCA-トリクロロ酢酸

TC培地-組織培養培地

TC-組織培養

tk-チミジンキナーゼ

TM-膜貫通

TMB-テトラメチルベンジジン

Tris-トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン

μCi-マイクロキュリー

μg-マイクログラム

μl-マイクロリットル

μM-マイクロモル

VEGF-血管内皮増殖因子

VSV-水疱性口内炎ウイルス

VV-ワクシニアウイルス

WB-ウェスタンブロッティング

WHO-世界保健機関

X-MLV-異種栄養性マウス白血病ウイルス

細胞株

AGS--原発性胃腺癌由来の細胞株 (Barranco and Townsend, Cancer Res., 43: 1703 (1983) and Invest. New Drugs, 1: 117 (1983)); CRL-1739としてATCCから入手可能;

A498--RCC細胞株(ATCC HTB-44)

BL-3--ウシ B リンパ球 (ATCC CRL-8037; 白血病細胞懸濁液; J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda) 40: 737(1968));

C33--ヒト 子宮頸癌生検由来の細胞株 (Auersperg, N., J.Natl.CancerInst. (Bethesda), 32: 135-148 (1964)); HTB-31としてATCCから入手可能;

C33A--ヒト子宮頸癌細胞 (ATCC HTB-31; J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda) 32: 135 (1964));

C4.5-CHO野生型、Ka13の親系統、Wood et al., J.Biol.Chem., 273: 8360-8368 (1998)に記載されたのと同じ細胞株;

COS--サル細胞株 (Gluzman, Y., Cell, 23: 175 (1981));

HeLa- American Type Culture Collection (ATCC)由来

HeLa K-- HeLa細胞の標準型;ヒト子宮頸部腺癌から単離された、異数性、上皮様細胞株 (Gey et al., CancerRes., 12: 264 (1952); Jones et al., Obstet. Gynecol., 38: 945-949 (1971)); B.Korych教授 (カレル大学医療微生物学および免疫学研究所; チェコ共和国プラハ) より入手;

HeLa D98/AH. 2(別名HeLa s)--ヒポキサンチン グアニンホスホリボシルトランスフェラ

10

20

30

40

50

ーゼ欠損(HGPRT<sup>-</sup>)である突然変異HeLaクローン、Eric J. Stanbridge (カリフォルニア大学アーバイン校医学部微生物学科、米国カリフォルニア州)より提供され、Stanbridge et al., Science, 215: 252-259 (15 Jan. 1982)で報告された;同じくE. J. Stanbridgeより入手したハイブリッド細胞 H/F-NおよびH/F-Tの親系統

HT29 直腸結腸癌に由来する細胞株 (ATCC No. HBT-38; DSMZ ACC299);

Ka13- HIF-1 サブユニットについて機能的に欠陥のあるCHO突然変異細胞、Wood et al. (1998)、前出に記載されたものと同一の細胞株;

KATO III--胃癌の転移型から調製された細胞株 (Sekiguichi et al., Japan J. Exp. Med., 48: 61 (1978)); HTB-103としてATCCから入手可能;

MDCK--MDCK細胞株は外見上正常な雌のコッカースパニエル成犬の腎臓からS. H. MadinおよびN. B. Barbyによって1958年に得られた。 (ATCC CCL-34); 10

NIH-3T3-- Aaronson, Science, 237: 178 (1987)で報告されたマウス線維芽細胞 細胞株;

QT35--ウズラ 線維肉腫細胞 (ECACC: 93120832; Cell, 11: 95 (1977));

Raj--ヒトバーキットリンパ腫細胞株 (ATCC CCL-86; Lancet, 1: 238 (1964));

Rat2TK<sup>-</sup>細胞株(ラット胚、チミジンキナーゼ突然変異株)は、Fischerラット線維芽細胞3T3様細胞株Rat15'-プロモデオキシウリジン耐性株のサブクローンから得られた;本細胞は感知可能なレベルの核チミジンキナーゼを有しない (Ahrens, B., Virology, 113: 408 (1981));

SiHa--ヒト子宮頸部扁平上皮癌細胞株 (ATCC HTB-35; Friedl et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 135: 543 (1990)); 20

XC--ラウス肉腫ウイルス誘導性ラット肉腫を用いて誘導されたラット横紋筋肉腫由来の細胞 (Svoboda, J., Natl. Cancer Center Institute Monograph No.17, IN : "International Conference on Avian Tumor Viruses" (J. W. Beard ed. ), pp. 277-298 (1964)); J an Svoboda (チェコスロバキア科学アカデミー分子遺伝学研究所;チェコ共和国プラハ)より提供;および

CGL1--H/F-Nハイブリッド細胞(HeLaD98/AH.2由来細胞);  
CGL2--H/F-Nハイブリッド細胞(HeLaD98/AH.2由来細胞);  
CGL3--H/F-Tハイブリッド細胞(HeLaD98/AH.2由来細胞);  
CGL4--H/F-Tハイブリッド細胞(HeLaD98/Ah.2由来細胞)。 30

#### ヌクレオチドおよびアミノ酸 配列 記号

下記の記号はここでヌクレオチドを表すのに用いられる:

塩基

記号 意味

A アデニン

C シトシン

G グアニン

T チミン

U ウラシル 40

I イノシン

M AまたはC

R AまたはG

W AまたはT / U

S CまたはG

Y CまたはT / U

K GまたはT / U

V AまたはCまたはG

H AまたはCまたはT / U

D AまたはGまたはT / U 50

B CまたはGまたはT/U  
N/X AまたはCまたはGまたはT/U

主要なアミノ酸は二十種類あり、そのそれぞれが、三個の隣接するヌクレオチドの異なる配列(トリプレットコードすなわちコドン)によって特定され、またアミノ酸は特定の順序で互いに結合して特徴的なタンパク質を形成する。三文字または一文字の慣習を用いてここではたとえば図1のように下記の通り前記アミノ酸を特定する:

アミノ酸名	3文字 略号	1文字 略号
アラニン	A l a	A
アルギニン	A r g	R
アスパラギン	A s n	N
アスパラギン酸	A s p	D
システイン	C y s	C
グルタミン酸	G l u	E
グルタミン	G l n	Q
グリシン	G l y	G
ヒスチジン	H i s	H
イソロイシン	I l e	I
ロイシン	L e u	L
リジン	L y s	K
メチオニン	M e t	M
フェニルアラニン	P h e	F
プロリン	P r o	P
セリン	S e r	S
スレオニン	T h r	T
トリプトファン	T r p	W
チロシン	T y r	Y
バリン	V a l	V
不明またはその他		X

【発明を実施するための最良の形態】

【0043】

下記の参考文献はここで引用されているかまたはMN/CA9 遺伝子および MN/CA IX タンパク質に関する最新の情報を提供する。列記したすべての参考文献およびここで引用された他の参考文献は特に引用により開示に含まれる。

M75モノクローナル抗体とは異なる特異性を有するCA IX特異的抗体を作製するための以前の試みは明らかに、ヒトCA IXがマウスホモログとは主にM75エピトープを含むN末端アミノ酸配列において異なるという事実が原因で不成功であった。この配列は、おそらく免疫されたマウスがそれを非自己として認識するため、強力に免疫原性であるように見えるが、免疫されたマウスはヒトCA IX分子の他のより保存された部分に対する体液性免疫を誘導しない。

【0044】

CA IX-欠損マウスから、ヒトCA IXタンパク質の異なる細胞外領域に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を作製する方法についての実施例1および2の詳細な方法をここに開示する。

【0045】

それらのモノクローナル抗体の詳細な特徴づけ、さまざまな免疫検出法におけるそれらの反応性の評価、およびエピトープの相対的位置をここに提供する。それらのモノクローナル抗体のさまざまな臨床的、診断/予後診断、治療的、および実験的有用性をさらに提

10

20

30

40

50



供する。

【 0 0 4 6 】

CA IX欠損マウスの作製および前記CA IX-欠損マウスから作製された新規CA IX-特異的抗体

実施例1は、MN/CA IX-欠損マウスを作製した方法を詳述する。ノックアウトマウスを用いて新規CA IX-特異的モノクローナル抗体(mabs)を作製し、そのmabの一部はCA IX免疫優性エピトープ以外に対するものであった。

【 0 0 4 7 】

M75mabとは異なるエピトープに対するモノクローナル抗体(mabs)を作製することおよび/またはM75mabと同一のエピトープ特異性を有するが異なる生物学的性質を有する抗体を作製することは、発明者の目的の一つであった。そのようなmabsを作製するために、発明者は、ここにおよびOrtova-Gut et al. (2002)に記載される通り、Car9 遺伝子(マウス MN/CA IX タンパク質をコードする)がターゲッティング破壊されたノックアウトマウスを用いたが、それは、そのノックアウトマウスはヒトMN/CA IXタンパク質全体を異物分子として認識し、ヒトMN/CA IXタンパク質のさまざまな領域に局在するエピトープに対する体液性免疫を生じる可能性があるからである。

対照的に、マウスMN/CA IXタンパク質を発現する野生型マウス(wtマウス)は、ヒトMN/CA IXのN末端部分にその免疫反応を向けるが、それはヒトMN/CA IXタンパク質のN末端部分がヒトMN/CA IXタンパク質の他のドメインよりもマウスタンパク質と異なるからである。wtマウスは、M75mabが結合するエピトープと近接するかまたは重複するエピトープに対する抗体を優先的に産生する。

【 0 0 4 8 】

ヒトMN/CA IXcDNAを遺伝子導入されたマウス細胞を用いてMN/CA IX-欠損マウスを免疫する最初の実験は不成功であり、それは産生されたすべてのmabsが、M75mabがそうである通り、ヒトMN/CA IXタンパク質のN末端ドメインに対するものであったためである。MN/CA IXタンパク質の他の領域中のエピトープに対するmabsを産生するのであれば、アミノ酸(aa)53-111(配列番号8)周辺、または好ましくはaa52-125(配列番号98)周辺での、別の免疫プロトコールが必要であると決定された。

【 0 0 4 9 】

克服すべきいくつかの課題があった。ハイブリドーマ作製中に、具体的な解決を要したいくつかの技術的問題があった。

最初に、必要な抗体の産生を確実にするために考案しなければならないのは、適切な免疫プロトコールであった。その目的のために、我々は、中心の炭酸脱水酵素ドメインを含むN末端PGドメインを欠いたCA IXタンパク質の組み換え変異体(下記の実施例2を参照、その免疫計画がMN/CA IX-特異的抗体の産生に結びついた)を含む異なる型の免疫原を用いた。他の技術的問題は、実施例1に説明した通り、MN/CA IX-特異的抗体の選択および非特異的抗体の除去を可能にする、適当なスクリーニング系の開発であった。

【 0 0 5 0 】

発明者は、MN/CA IXの中心の炭酸脱水酵素ドメイン(CA IXドメイン)だけを含むが、N末端PGドメインおよび膜貫通領域および細胞質内領域を欠く、ヒトMN/CA IXタンパク質の組み換え変異体を作製した。CA IXドメインをコードするcDNAをグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)と融合し、細菌で発現させ、グルタチオンS-セファロース(Pharmacia)を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。GST-CA IXタンパク質を、セファロースに結合させてまたはマトリクスから溶出して、3つ目の免疫投与として接種した。改良した免疫プロトコール、新規融合、ハイブリドーマの収量、およびMN/CA IX 特異的クローンの数は、実施例2の表に要約されている。

10種類の新規融合が作製され、8000を超えるクローンが生育し、スクリーニングされた。最適な生存可能性および安定した抗体産生のハイブリドーマを選択するため、すべてのMN/CA IX-特異的ハイブリドーマは凍結-再凍結プロトコールおよびその後のサブクローニングに供された(各クローンについて少なくとも100のサブクローン)。その非常に重要な

努力の結果として、MN/CA-IX-特異的モノクローナル抗体を合成する11種類のハイブリドーマが作製された。

新規MN/CA IX-特異的mabsは分析してそれらのアイソタイプを決定し、実施例2に記載された通り、それらの反応性について異なる免疫検出法によって広範囲に試験した。IgGの定常領域はその生物学的活性と密接に関連しているため、mabアイソタイプの知識は重要である。

さまざまなアイソタイプは、補体活性化および抗体依存性細胞媒介細胞障害を含む、異なるエフェクター機能を実行する。新規抗体の大部分はIgG2aアイソタイプであった。それらは試験したすべての方法、すなわちELISA、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、および免疫蛍光で、完全長MN/CA IXタンパク質を認識し結合することができた。Fc断片を介してプロテインAセファロースに結合する能力が無いかまたは低下しているため、免疫沈降で反応しなかった、2種類のIgMおよび2種類のIgG1抗体もあった。しかし、それらの抗体は、ELISA、ウェスタンブロッティング、および免疫蛍光でMN/CA IX-特異的反応性を示した。その結果は、新規抗体は未変性および変性MN/CA IXタンパク質の両方を認識し、また異なる免疫検出手法で有用である可能性があることを示す。

#### 【0051】

新規抗体のドメイン特異性を決定するため、発明者は完全長MN/CA IX抗原およびCAドメインを欠く抗原を用いて、Mab反応性を免疫沈降および免疫蛍光の両方で試験した。モノクローナル抗体VII/20、VII/28、VII/32、VII/38、V/10、およびV/12は完全長MN/CA IXタンパク質を免疫沈降させたが、CA欠失変異体とは反応しなかった。同様の反応性が免疫蛍光実験で観察され、それらの抗体がMN/CA IXのCAドメインに特異的であることを示した。

#### 【0052】

抗CA特異性が予測されたMabVII/13は、完全長MN/CA IXとウェスタンブロッティングに際して良好に反応した。その一方で、MabVII/13は免疫沈降 または免疫蛍光では何ら反応性を示さなかった。発明者は、そのmabは、抗原の完全な変性後にのみ露出することができ、未変性または部分的にのみ変性したタンパク質では隠れたままである、隠れたエピトープに対するものである可能性があると考えた。

MN/CA IXのN-末端PGドメインに対する特異性が提示されている4種類の新規mabのうち、3種類(IV/6、IV/14、IW11)が、プロテインAに結合しないため、免疫沈降に用いることができないアイソタイプであった。抗体IV/18は完全長MN/CA IXタンパク質を免疫沈降させることができたが、CA欠失変異体を免疫沈降させることはできなかった。その一方、IV/18は免疫蛍光では両方の型の抗原と良好に反応した。驚くべきことに、MabIV/11は免疫蛍光実験でFLおよびCAとの細胞質反応性を示した。その結果は、そのタンパク質の未熟な細胞質内型に対するMabIV/11の特異性によって説明できる。

#### 【0053】

新規モノクローナル抗体の予測されたドメイン特異性は、ハイブリドーマ培地の試料で、ピオチン化M75mabおよび個別のmabsを用いた競合ELISAで測定された、MN/CA IXへの結合についてM75mabと競合する能力に対応する。予備的データは、M75mabsのものとは異なるエピトープの、7種類の新規モノクローナル抗体を作製することに発明者が成功したことを示す。別の4種類の新規mabsは、M75mabのエピトープと重複するエピトープに対するように見えるが、M75mabとは異なるアイソタイプを有する。

#### 【0054】

#### 新規モノクローナル抗体のin vitro生物学的活性の研究

モノクローナル抗体の最も興味深くまた重要な特性は、腫瘍細胞増殖に干渉する能力であり、その能力は抗腫瘍治療で利用できる。モノクローナル抗体の生物学的活性は、そのアイソタイプ、または受容体分子と結合してシグナル伝達経路を阻害する能力のいずれかと関連している可能性がある。アイソタイプは、腫瘍に対する細胞障害性抗体の作用(たとえば、抗体依存性細胞媒介細胞障害、ADCC、および補体媒介細胞溶解)に実質的に寄与する、Fc-受容体依存性機構を決定する。IgG1およびIgG2aアイソタイプのいくつかのマウ

スモノクローナル抗体、および異なる抗原(HER2/neu、CD20、PSCAを含む)に対する特異性は、ADCCを刺激することが示されている。一部の抗体はまた、受容体-リガンド遮断、またはアポトーシス促進反応の開始(たとえばHER2/neuに対するヒト化IgG1抗体であるトラストズマブ(trastuzumab)、およびその「親」マウス抗体)による「直接」活性も有するであろう。

#### 【0055】

MN/CA IXに特異的な新規モノクローナル抗体の治療的可能性の評価の第一段階として、発明者はin vitroの腫瘍細胞増殖および浸潤に対するそのmabの効果を分析している。細胞は異なる条件で培養されており(正常酸素圧、低酸素、血清飢餓、低グルコースを含む)、そしてさまざまな濃度の精製mabsで処理されている。処理細胞の増殖はMTS分析によって測定され、アポトーシスの程度はTdT標識およびFACS分析によって測定される。加えて、マトリゲル膜を通しての腫瘍細胞のin vitro浸潤に影響を与える新規mabsの能力もまた分析される。Mabsは化学治療薬と治療的に組み合わせることができる。そのような組み合わせは、また典型的なマウスモノクローナル抗体から開発されたトラストズマブについて効果的であることが示されている。したがって、潜在的な治療の有効性を有するmabを選択するための、薬剤とMN/CA IX-特異的抗体治療との相加効果を調査している。そのようなmabsの、部分的または完全にヒト化した型を調製することができる。

MN/CA IXのCAドメインと反応するモノクローナル抗体は、MN/CA IXの酵素活性を阻害する潜在能力を評価するための追加の分析に供される。酵素活性はMN/CA IXの生物学的役割に高度に関係すると考えられている。したがって、「抗触媒」抗体が腫瘍生物学におけるMN/CA IXのCA活性の真の意義を解明するために有用な手段となり、またおそらく腫瘍増殖の調節に作用するであろう。

また、発明者は、MN/CA IX-特異的抗体の、ADCCをin vitroで誘導する能力を評価した。新規抗体の大部分はIgG2aアイソタイプであり、2種類がIgG1アイソタイプであって、両方のアイソタイプが補体および細胞媒介細胞溶解において有効であることが示された。

#### マウスMN/CA IXタンパク質に対するモノクローナル抗体の作製

発明者は、腫瘍低酸素および抗低酸素性治療手法の前臨床研究に関わる研究者は、実験的に誘導されたマウス腫瘍における低酸素のマーカーとしての、マウスMN/CA IXの検出のための特異的抗体の使用を希望すると考える。M75mabはその目的には適切でない。M75mabはラットおよびブタタンパク質を認識するが、マウスホモログを認識せず、それはM75mabのエピトープがマウスMN/CA IXの一次構造で保存されていないからである。

#### 【0056】

マウスMN/CA IXタンパク質をコードするタンパク質が入手可能であるため、MN/CA IX-欠損マウスの免疫および対応するモノクローナル抗体の作製に用いることができる組み換え抗原の十分な量の作成が可能である。マウスMN/CA IXタンパク質に対するそのようなmabsは、動物モデルを利用した腫瘍進行の将来の研究にとって非常に有用である可能性がある。加えて、抗マウスmabsは、ヒト腫瘍細胞を異種移植された免疫不全動物の必要無しに、MN/CA IX陽性腫瘍の治療的ターゲティングの前臨床実験の有用な手法になるであろう。

#### 【0057】

ヒトMN/CA IXに対する新規mabsの一部がマウスタンパク質と交差反応するかどうか調べられている。特に、マウスおよびヒトMN/CA IXタンパク質は主にN末端PG様領域で異なるがCAドメインでは高い配列ホモロジーを示すため、CAドメインに対するmabsは良い候補である。したがって、抗ヒトmabsのマウス抗原(組み換え、およびマウスcDNAを遺伝子導入された細胞から抽出されたものの両方)に対する反応が試験されている。

#### 【0058】

実施例1は、CA IX-欠損マウス(Car9の完全欠失突然変異を有するマウス)をターゲティング遺伝子破壊によって調製した方法に関する詳細を提供する。実施例1はまた、Car9cDNAおよびマウスCA IXをコードする遺伝子の同定、Car9遺伝子のターゲティング破壊の

表現型的結果、およびそれらがCA IXの生理学的意義の理解に及ぼす影響も報告する。

【0059】

CA IXは、接着性を有する高度に活性な酵素であり、機能的に酸塩基平衡および細胞内情報伝達に関係するとされる。CA IXは通常消化管上皮の基底外側膜に存在し、多くの癌で異所性に発現される。CA IX欠損マウスはその生理学的意義について多くを明らかにした。

【0060】

この突然変異について同型接合であるマウスは、多数の嚢胞を伴う胃の腺上皮の過形成を生じた。最初の変化は新生仔で観察され、CA IXの発生への関与を示した。胃体の過形成は、4週齢のマウスにおける胃形態形成の終わりで顕著になった。CA IXの欠損は、粘液分泌胃粘膜細胞の過剰産生およびペプシノゲン陽性主細胞とH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase陽性旁細胞との両方の減少に繋がる。

【0061】

Car9完全欠失突然変異の表現型的結果は、細胞増殖および分化の調節を介した腺胃上皮の形態形成およびホメオスタシスにおけるCA IXの重要で重複していない役割を実証すると結論された。これらの点に関するさらなる詳細は、実施例1および Ortova-Gut et al., Gastroenterology, 123: 1889-1903 (2002)に見ることができ、後者は説明付き写真を示している。

【0062】

CAドメインに対するCA IX特異的抗体の産生を可能にする本開示を用いて当業者は、他のCA IXドメインに対するCA IX-特異的抗体を同様に作製することができる。たとえば、下記の実施例2のプロトコールで追加免疫としてGSTに融合したCA IXの組み換えCAドメインを用いる代わりに、CA IXの組み換えTM(配列番号6)ドメインまたは組み換えIC(配列番号7)ドメインを用いることで、主に追加免疫として用いたそれぞれのドメインに対する抗体が作製されることを当業者は理解する。そのような方法の従来の変法、たとえば、選択されたドメインの合成タンパク質/ポリペプチドを用いることは当該分野の技術の範囲内である。

【0063】

当業者はまた、当該分野で既知の従来法によって、CA IXの他のドメインに対する抗体を作製することができる。たとえば、CA IX領域由来のペプチドを、たとえばスカシ貝ヘモシアニン(KLH)といった担体と結合させて、選択したペプチドに対するポリクローナルまたはモノクローナルのいずれかの抗体を作製することができる。そのような抗体は、結果として得られた抗体が選択したドメインに対して特異的であるかどうかを判定する従来する方法によってスクリーニングすることができる。抗ペプチド作製サービスが、たとえば、米国オレゴン州タイガード(Tigard)のAves Labs, Inc.から市販されている。

【0064】

PGドメインおよび近隣領域中の免疫優性エピトープ

図4は完全長CA IXの基本構造を模式的に示す。上記に示す通り、細胞外ドメインはPGおよびCAドメイン、そして一部のスペーサーまたはおそらくヒンジ領域を含む。CA IX免疫優性エピトープはaa53-111(配列番号8)付近、またはaa52-125(配列番号98)付近のPG領域に主として存在し、好ましくは現在aa52-125(配列番号98)付近と考えられている。CA IXの免疫優性エピトープは、PG領域に隣接する領域に位置する可能性がある。たとえば、aa36-51(配列番号21)のエピトープは免疫優性エピトープと考えられる。

【0065】

主なCA IX免疫優性エピトープはM75mabに対するものである。M75モノクローナル抗体は、CA IXのN末端のプロテオグリカン様(PG)領域中の免疫優性エピトープに対すると考えられている。M75のエピトープはアミノ酸配列PGEEDLP(配列番号11)と同定されており、これはCA IXのN末端PG領域中で4回同一に反復されている(Zavada et al.(2000))。M75mabもまた結合し得る近縁のエピトープは、免疫優性エピトープの典型でもあり、たとえば、予測CA IXアミノ酸配列を示す図1A-1Cのアミノ酸(aa)61-96(配列番号12)に見出すことがで

10

20

30

40

50

きる免疫優性6回タンデムリピートを含む。PGドメイン内の免疫優性タンデムリピートエピトープの変化は、GEEDLP(配列番号13)(aa61-66、aa79-84、aa85-90、およびaa91-96)、EEDL(配列番号14)(aa62-65、aa80-83、aa86-89、aa92-95)、EEDLP(配列番号15)(aa62-66、aa80-84、aa86-90、aa92-96)、EDLPSE(配列番号16)(aa63-68)、EEDLPSE(配列番号17)(aa62-68)、DLPGEE(配列番号18)(aa82-87、aa88-93)、EEDLPS(配列番号19)(aa62-67)、およびGEDDPL(配列番号20)(aa55-60)を含む。他の免疫優性エピトープは、たとえば、aa68-91(配列番号22)を含んでいてよい。

#### 【0066】

モノクローナル抗体MN9およびMN12は、それぞれN末端PG領域内の配列番号19-20の免疫優性エピトープに対すると考えられているMN7モノクローナル抗体は、PG領域atof図1A-1Cのaa127-147(配列番号23)のPG領域に隣接する免疫優性エピトープに対する抗体であろう。

10

#### 【0067】

CAドメイン(配列番号9)内の好ましいと考えられるエピトープは、aa279-291(配列番号67)付近に由来する。細胞内ドメイン(ICドメイン)(配列番号7)内の好ましいと考えられるエピトープは、aa435-450(配列番号68)付近に由来する。

#### 【0068】

配列番号69(図1A-1Cの166-397)は、CAドメインの重要な抗原性成分と考えられている。CAドメイン内にはいくつかの抗原性部位が存在する。図6に示すように、CA IX-欠損マウスで調製されたCA IX-特異的モノクローナル抗体には4つのグループがあり、それらはCAドメインに対するものであり;それらのグループのうち3つが配列番号69の内部にある。

20

#### 【0069】

#### S-CA IX

ここで実施例は、以前に記載されたCA IXの細胞結合型(p54/58)に加えて、CA IXの可溶型が存在することを示す。下記の実施例3-9で記載するように、s-CA IXは、HT29等の腫瘍細胞株に由来する組織培養培地中に観察されている。さらに、我々は癌患者の血清および尿中にs-CA IXを見出している。

#### 【0070】

本発明に記載のCA IXタンパク質/ポリペプチドの好ましい可溶型は、図1(配列番号2)に示す通りの推論アミノ酸配列を有するCA IXタンパク質と実質的なホモロジーを有するタンパク質および/またはポリペプチドである。たとえば、そのような実質的に相同である可溶性CA IXタンパク質/ポリペプチドは、本発明のCA IX-特異的抗体、好ましくはMabs M75、V-10、またはそれらの同等物と反応することができるものである。

30

#### 【0071】

新生物性細胞によってin vivoで産生されるタンパク質またはポリペプチドは、細胞培養中の腫瘍細胞によって、または形質転換細胞によって産生されたものとは配列が異なる可能性があることもまた理解される。したがって、アミノ酸置換、伸長、欠失、短縮、およびその組み合わせを制限無く含む、さまざまなアミノ酸配列を有するCA IXタンパク質および/またはポリペプチドは、本発明の範囲内にある。体液中に現存するタンパク質は、タンパク質分解過程といった分解過程の対象となることもまた理解される;したがって、相当に短縮された可溶性CA IXタンパク質およびCA IXポリペプチドが、たとえば血清といった体液中に見出される。「CA IX抗原」の語句は、ここではCA IXタンパク質および/またはポリペプチドを包含するように用いられる。

40

#### 【0072】

#### 分析法

本発明に記載の分析法は、脊椎動物試料、好ましくは哺乳類試料、より好ましくはヒト試料中のCA IX抗原の可溶型を検出および/または定量するために提供される。CA IX抗原の可溶型は、他の技術の中でも、たとえば、ウェスタンブロッティングまたはラジオイムノアッセイといった、イムノアッセイによって検出される。

CA IX抗原の可溶型を、細胞外ドメインとして分析するのに好ましい試料は体液であり

50

、中でも下記を含むことができる：血液、血清、血漿、精液、乳房分泌物、胃分泌物、糞便懸濁液、胆汁、唾液、涙液、痰、粘液、尿、リンパ液、細胞質ゾル、腹水、胸水、羊水、膀胱洗液、気管支肺胞洗浄液および脳脊髄液。

可溶性CA IX抗原は試験の前により大きい量の体液から濃縮することが好ましい(下記の実施例3-11が代表的である)。分析するのに好ましい体液は、検査する癌の型によって決まるが、一般的に好ましい体液は、尿、血清、粘液、胃分泌液、胆汁、乳房分泌物、胸水、および腹水である。

#### 【0073】

本発明の分析法は診断的および/または予後診断的の両方であり、すなわち、診断的/予後診断的である。「診断的/予後診断的」の用語はここでは臨床状況次第で個別にまたは累積的に下記の過程を包含すると定義される：疾患の存在を判定する、疾患の性質を判定する、一つの疾患を別の疾患と識別する、疾患状態の推定結果に関して予測する、症例の性質および症状によって示される通り疾患からの回復の見込みを判定する、患者の疾患状態を監視する、患者を疾患の再発について監視する、および/または患者のための好ましい治療計画を決定する。本発明の診断/予後診断法は、たとえば、新生物性または前新生物性疾患の存在について集団をスクリーニングする、新生物性疾患を発症するリスクを判定する、新生物性および/または前新生物性疾患の存在を診断する、新生物性疾患を有する患者の疾患状態を監視する、および/または新生物性疾患の経過について予測を割り出すために有用である。

本発明は、上記に示す通り幅広い新生物性疾患の存在についてのスクリーニングに有用である。本発明は、たとえば、宿主から新しく除去された細胞の集団において、悪性または悪性前細胞の存在の可能性を評価するための方法および組成物を提供する。そのような分析法は、腫瘍を検出するのに、および疾患の診断および予測を助けるのに用いることができる。その分析法はまた、手術、癌化学療法および/または放射線治療後に、腫瘍組織が存在しないこと、またはすべての腫瘍組織の除去を確認するために用いることができる。その分析法はさらに、癌化学療法および腫瘍再発を監視するのに用いることができる。

#### 【0074】

我々は下記の実施例で報告される実験において、ウェスタンブロットの方法を用いて、ヒト尿および血清中の可溶性CA IXタンパク質の存在を確認した。この方法は時間を要しまた労力を要する。しかし、CA IX抗原の可溶性の存在は、いくつかの明確な診断分析法を用いて検出および/または定量することができる。当業者は、任意の従来のイムノアッセイ形式を、可溶性CA IX抗原を検出および/または定量するのに応用することができる。本発明の方法のために好ましい診断的形式は、二抗体サンドイッチアッセイである。CA IX抗原およびCA IX-特異的抗体の検出のための多数の他の形式ももちろん利用可能である。それらは、診断産業においてすべて通常用いられる他の分析法の中でも、ウェスタンブロット、ELISA(酵素結合免疫吸着法)、RIAs(ラジオイムノアッセイ)、競合EIA、または二抗体サンドイッチアッセイであろう。そのようなイムノアッセイでは、結果の解釈は、抗体または抗体の組み合わせは、試料中に存在しCA IXとは無関係である他のタンパク質およびタンパク質断片とは交差反応しないという仮定に基づく。

適切な検出手段は、放射性ヌクレオチド、酵素、補酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤、酵素基質、またはコファクターのような標識、酵素阻害剤、フリーラジカル、微粒子、色素、などを含む。そのような標識試薬は、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ、たとえばELISA、蛍光イムノアッセイ、などといったさまざまなよく知られた分析法で用いることができる。たとえば、米国特許第3,766,162号；第3,791,932号；第3,817,837号；および第4,233,402号明細書を参照。

本発明の分析法に有用な抗体を調製する方法を下に記載する。下記の実施例は本発明に記載の代表的な分析法を詳述する。

可溶性CA IX抗原に対する二抗体サンドイッチELISAアッセイの一つの型の代表は、CA IXタンパク質/ポリペプチドの細胞外ドメインに対して作製した抗体かまたはCA IXタンバ

10

20

30

40

50

ク質を発現する全細胞に対して作製した抗体でマイクロタイタープレートを被覆し、これに患者体液試料、たとえば血清または尿を加える形式である。抗原を抗体に結合させるのに十分なインキュベート期間後、プレートを洗浄し、別の酵素に結合した抗CA IX抗体を加え、インキュベートして反応させ、プレートをその後再度洗浄する。その後、酵素基質をマイクロタイタープレートに加え、特定時間インキュベートして酵素を基質に作用させ、最終調製物の吸光度を測定する。吸光度の大きな変化は、陽性結果を示す。本発明の好ましい一実施形態では、二抗体サンドイッチアッセイの第一のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマVU-M75によって分泌されるM75と指定されたモノクローナル抗体より成る群から選択され、第二の酵素結合モノクローナル抗体は、M75モノクローナル抗体が結合するエピトープ以外のエピトープに対するモノクローナル抗体、より好ましくはプロテオグリカンドメイン以外のエピトープに対するモノクローナル抗体より成る群から選択される。

10

#### 【0075】

CA IXタンパク質および/またはポリペプチドが、患者の体液中の可溶性CA IX抗原の存在を検出および/または定量するのに用いることができることもまた、イムノアッセイの当業者には明らかである。そのような一実施形態では、CA IXタンパク質/ポリペプチドを標識し、体液試料を加えてCA IXタンパク質/ポリペプチドに特異的な抗体への標識CA IXタンパク質/ポリペプチドの結合と競合させる、競合イムノアッセイが用いられる。

別の一実施形態では、CA IX タンパク質 または細胞外ドメインを含むポリペプチド に対して作製された標識抗体を用いる、免疫測定法を用いることができる。そのような分析法では、抗原結合抗体と複合体を形成する標識抗体の量は、試料中の可溶性 CA IX 抗原の量と正比例する。

20

脊椎動物試料中の可溶性CA IX抗原を検出および/または定量するための本発明の典型的なイムノアッセイ法は下記の工程を含む:a)前記脊椎動物試料と、一種類が標識されているかまたは他の方法によって検出可能である、可溶性CA IX抗原と結合する一種類以上の抗体(一種類または複数種類の抗体)とをインキュベートする;b)インキュベートした試料を、可溶性CA IX抗原および前記抗体を含む免疫複合体の存在について調べる。

本発明に記載の別の典型的イムノアッセイ法は、競合イムノアッセイを用いて脊椎動物試料の可溶性CA IX抗原を検出および/または定量するものであり、また、前記方法は下記の工程を含む:a)脊椎動物試料と、一種類以上のCA IX-特異的抗体および特定量の標識したまたはその他の方法によって検出可能なCA IXタンパク質/ポリペプチドとをインキュベートする、ここで前記CA IXタンパク質/ポリペプチドは、前記抗体との結合に関して試料中に存在する可溶性CA IX抗原と競合する;b)インキュベートした試料を評価し、前記抗体と結合した標識/検出可能なCA IXタンパク質/ポリペプチドの量を測定する;およびc)工程b)の評価結果から、可溶性CA IX抗原が前記試料中に存在するかどうか、および/または前記試料中に存在する可溶性CA IX抗原の量を判定する。

30

#### 【0076】

適切な特異性を有する抗体(生物学的に活性である抗体断片を含む)がいったん調製されれば、幅広い免疫学的分析法を利用して、特異的抗体-抗原複合体の形成を測定することができる。数々の競合および非競合タンパク質結合分析法が科学文献および特許文献に記載されており、そのような分析法の多数が市販されている。血清抗原の検出に適切である典型的なイムノアッセイは、米国特許第3,984,533号;第3,996,345号;第4,034,074号;および第4,098,876号明細書に記載されたものを含む。

40

#### 【0077】

代表的CA IX-特異的抗体であるモノクローナル抗体M75(MabM75)を産生するハイブリドーマは、上記の通りATCCに番号HB11128として寄託された。M75抗体はCA IXタンパク質を発見および同定するのに用いられ、ウェスタンブロットで、ラジオイムノアッセイで、および免疫組織化学的に、たとえば、新鮮、凍結、またはホルマリン、アルコール、アセトン、またはその他の方法で固定されたおよび/またはパラフィン包埋され脱パラフィンされた組織試料中で、容易にCA IX抗原を同定するのに用いることができる。

50

### イムノアッセイ検査キット

上記に概説した分析法は、可溶性CA IX抗原を検出および/または定量するための検査キットに具体化することができる。可溶性CA IX抗原を検出および/または定量するためのキットは、CA IXタンパク質/ポリペプチドを含んでいてよい。そのような診断/予後診断検査キットは一種類以上の組のポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗体をサンドイッチ形式のために含むことができ、ここで抗体は可溶性CA IX抗原上のエピトープを認識し、一つの組は適当に標識されているかまたは他の方法で検出可能である。

#### 【0078】

標識された(または他の方法で検出可能な)CA IXタンパク質/ポリペプチドと試料中のCA IX抗原との間で抗体への結合について競合が存在する分析形式のための検査キットは、最適な感受性および精度を与える量での標識タンパク質/ポリペプチドと抗体の組み合わせを含むことができる。

#### 【0079】

酵素-イムノアッセイでの用途のためのキットは典型的には、酵素標識試薬および酵素のための基質を含む。その酵素は、たとえば、本発明のCA IX-特異的抗体かまたはそのようなCA IX-特異的抗体に対する抗体のいずれかと結合することができる。検査キットは、たとえば、下記の実施例8に概説された通りの好ましい分析法を実施するため、必要に応じて他の構成成分を含むことができる。そのような検査キットは、従来の分析法のための他の適当な形式を有することができる。

### CA IX-特異的抗体の調製

「抗体」の語は、ここでは抗体全体だけでなく抗体の生物学的に活性である断片、好ましくは抗原結合領域を含む断片も含むと定義される。本発明に記載のイムノアッセイにおける用途に適切である、M75のようなCA IX-特異的抗体の調製の詳細は記載されている (Zavada et al., 米国特許第5,387, 676号明細書)。そのような抗体は、従来の方法論によっておよび/または遺伝子工学によって調製することができる。抗体断片は、好ましくは超可変領域を含む軽鎖 および/または重鎖 ( $V_H$ および $V_L$ )の可変領域から、およびさらにより好ましくは $V_H$ および $V_L$ 領域の両方から遺伝子組み換えすることができる。たとえば、ここで用いられる「抗体」の語は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体ならびにその生物学的に活性である断片を包含し、他の可能性の中でも、「一価」抗体 (Glenne et al., Nature, 295: 712 (1982)) ; 共有結合的にまたは非共有結合的に凝集していても、Fab'および $F(ab')_2$ 断片を含むFabタンパク質;軽鎖または重鎖単独、好ましくは重鎖および軽鎖の可変領域( $V_H$ および $V_L$ 領域)、およびより好ましくは超可変領域(前記 $V_H$ および $V_L$ 領域の相補性決定領域(CDRs)ともいう)を含む;Fcタンパク質;一種類より多い抗原に結合する能力のある「ハイブリッド」抗体;定常-可変領域キメラ;異なる起源の重鎖と軽鎖を有する「複合」免疫グロブリン;標準的組み換え技術によって、またはオリゴヌクレオチド指向性突然変異誘発技術によって調製された、特異性およびその他の特性が改良された「改変」抗体 (Dalbadie-McFarland et al., PNAS (USA), 79: 6409 (1982))を含む。

イムノアッセイの分野でよく知られた、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を作製する従来技術がある。CA IX-特異的抗体を作製するための免疫原は、中でも、好ましくは精製された、CA IXタンパク質および/またはポリペプチドを含む。

#### 【0080】

抗ペプチド抗体は、米国特許第44,710号明細書 (1982年7月27日に公開)に記載されているように、本分野の従来法によっても作製される。要約すると、そのような抗ペプチド抗体は、図1からのようなCA IXアミノ酸配列からペプチドを選択し、化学的にそれを合成し、それを適当な免疫原性タンパク質と結合し、それを適当な動物、通常はウサギまたはマウスに注射することによって作製される;このように、ポリクローナルまたはモノクローナルのいずれかの抗体が作製され、後者はKohler-Milstein法による。

#### 【0081】

従来のハイブリドーマ技術に加えて、より新しい技術を用いて本発明の抗体を作製する

10

20

30

40

50



ことができる。たとえば、抗体V-遺伝子をクローニングし発現するためのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の使用、および結合活性を有する断片をコードする抗体遺伝子を選択するためのファージディスプレイ技術の結果として、免疫したマウスまたはヒトを用いて、PCR増幅したV-遺伝子のレパトリーから抗体断片が単離されている(Marks et al., BioTechnology, 10: 779 (1992))。組み換え技術による抗体調製の詳細は、たとえば、米国特許第4,816,567号明細書(1989年3月28日に発行)に見ることができる。

#### 【0082】

#### モノクローナル抗体の調製

本発明の分析法における用途のためのモノクローナル抗体は、本分野でよく知られた方法によって得ることができる。MAbM75を分泌するハイブリドーマVU-M75の作製は典型的であり下記に説明する。MAbM75は、さまざまな診断的臨床検査において、たとえば、腫瘍細胞培養中または臨床試料中にCA IXタンパク質/ポリペプチドを検出する役割を果たす。

#### 【0083】

本発明に規定のモノクローナル抗体は、適当な哺乳類、好ましくは齧歯類、より好ましくはウサギまたはマウスを、たとえば、必要に応じて担体タンパク質に結合したCA IXタンパク質/ポリペプチドといった、適当な免疫原を用いて免疫することによって作製することができる。

#### 【0084】

体液中のs-CA IX抗原の検出において克服すべき一つの障害は、血清および尿中のs-CA IXの、10-100pg/mLのオーダーの、極端に低い濃度であった。そのような抗原を検出するためには、CA IXの重複していないエピトープに対する2種類の異なるモノクローナル抗体を用いる必要がある。しかし、現在まで、CA IXタンパク質を検出する用途では、ただ一種類の適切なモノクローナル抗体であるM75だけが利用可能である。近年、実施例2に記載の通り、Car9遺伝子がターゲッティング破壊されているノックアウトマウスを用いてCA IXタンパク質の抗原性部位に特異的な一連のモノクローナル抗体を作製することによって、発明者はこの障害を克服した。MAbM75はCA IXタンパク質のプロテオグリカン(PG)ドメインに特異的であるのに対して、MAbV-10(Car9のノックアウトによって作製されたMAbの一つ)は炭酸脱水酵素(CA)ドメインに特異的である。2種類のモノクローナル抗体の組み合わせおよび希釈度を最適化することによって、発明者は極めて高感度で特異性の高い反応を得ることができた。

#### 【0085】

#### MAbM75

モノクローナル抗体M75(MAbM75)は、マウスリンパ球ハイブリドーマVU-M75によって産生され、VU-M75はスロバキア科学アカデミー・ウイルス学研究所のハイブリドーマバンク(Collection of Hybridomas)(チェコスロバキア、ブラチスラバ(Bratislava))に最初に寄託され、ATCC番号HB11128として1992年9月17日にAmerican Type Culture Collection(ATCC)に寄託された。ハイブリドーマVU-M75の作製は国際公開第93/18152号(Zavada et al.)に記載されている。

MAbM75は、非グリコシル化GST-CA IX融合タンパク質およびCGL3細胞で発現された未変性CA IXタンパク質の両方を同様に良好に認識する。M75MAbはCA IXタンパク質の未変性型および変性型の両方を認識する(Pastorekova et al.(1992))。

可溶性CA IXタンパク質/ポリペプチドを検出するのに有用な本発明に記載のモノクローナル抗体は、標識の中でも、たとえば、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)のような酵素、蛍光化合物、または、<sup>125</sup>Iのような放射性同位体を用いて、任意の従来の方法で標識することができる。本発明に記載の好ましい標識は<sup>125</sup>Iであり、また抗体を標識化する好ましい方法は、クロラミン-Tを用いることによる(Hunter, W.M., "Radioimmunoassay," In: Handbook of Experimental Immunology, pp. 14.1-14.40 (D. W. Weir ed.; Blackwell, Oxford/London/Edinburgh/Melbourne; 1978))。ペルオキシダーゼを用いて抗体を標識する方法もまた好ましい。

腫瘍細胞によって組織培養中に脱落し、癌患者の尿および血清中に検出される、CA IX

10

20

30

40

50

タンパク質の可溶型(s-CA IX)がここに記載されている。腫瘍細胞から培地中に脱落するs-CA IXは幾らか短くなっている。本発明の一実施形態では、細胞結合型CA IXタンパク質(p54/58)と比較して、s-CA IXタンパク質は50および54kDaへと短くなっている。この大きさはCA IX分子の細胞外部分に相当し、その細胞外部分は、分子の残りの部分であるCA IXのTM(膜貫通部分)およびIC(細胞内尾部)から切断された、PG(プロテオグリカン様)およびCA(炭酸脱水酵素)ドメインから構成されている(図4を参照)。s-CA IXのp50/54型は、PGに特異的であるMAbM75とCAドメインに特異的であるMAbV-10との両方と反応するため、PGおよびCAの両方のドメインを含む。

#### 【0086】

表在性膀胱癌におけるCA IX発現の高い頻度および顕著な促進は、正常移行上皮における相対的な不存在、およびCA IXは腫瘍患者尿中に見出される膜貫通タンパク質であるという事実と相まって、尿中の脱落タンパク質の測定は再発マーカー候補になり得る可能性を示唆する。

#### 【0087】

s-CA IXは、組み換え的に、合成的に、またはその他の生物学的方法によって、たとえばタンパク質分解切断、またはMN/CA IXを発現する適当な細胞株の組織培地からの精製によって作製することができ、そして治療的におよび/または診断的に/予後診断的に使用することができる。一つの理論は、そのようなs-CA IXを用いてCA IXに対する未知のリガンドを封鎖することができるというものであり、その未知のリガンドは発癌作用を結果として生じるシグナル伝達を活性化すると考えられている。s-CA IXのもう一つの治療的用途はワクチンとしてのものである。

#### 【0088】

s-CA IXは、診断的に/予後診断的に、たとえば、体液中のMN/CA-IX-特異的抗体を検出するために、または患者の体液中に天然に存在する同等な大きさの型のs-CA IXを検出する分析において校正用にまたは対照として用いることができる。特定した用途のそれぞれについて、好ましくは、s-CA IXの作製した型は実質的に、約50/54kdの分子量を有するCA IX細胞外ドメイン(配列番号5)である。

#### 【0089】

CA IXは膀胱癌が存在する場合に膀胱の内腔表面上に発現することが知られているため(Turner et al., Br. J. Cancer, 86: 1276-1282 (2002))、またCA IXは膜貫通タンパク質であるため、尿中の脱落タンパク質の測定は再発のマーカーになり得ると仮定することができる。そのような「脱落タンパク質」はs-CA IXであり、主にCA IXの細胞外ドメイン(配列番号5)として現在知られている。

#### 【0090】

#### C-erbB-2およびCA IXの同時発現

実施例11は、正常、良性および悪性の乳房組織中におけるCA IXの分布、ならびにエストロゲン受容体(ER)、c-erbB2、c-erbB3およびCD44を含む乳癌マーカーの発現との比較を開示する。組織標本は、免疫組織化学法および/または逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を用いて分析した。CA IXは、IHCによって、悪性組織の12/26(46%)、良性病変の4/36(11%)に検出されたが、正常乳房10例には検出されなかった。染色はほとんど異常な上皮細胞の細胞膜に局在したが、5例では隣接する間質に見られた。半定量的RT-PCRでは、CA9mRNAが、悪性腫瘍の25/39(64%)に、良性病変の11/33(33%)に検出されたが、正常乳房3例のいずれにも検出されなかった。悪性組織の比較RT-PCR分析は、CA9陽性とc-erbB2過剰発現との間の関連性を明らかにした( $p=0.05$ )。さらに、CA9陽性標本は、CA9陰性のものよりも有意に高いc-erbB2の中央値レベルを示した( $p=0.02$ )。他のマーカーとの有意な関連性は認められなかった。この試験の結果は、乳癌発生にCA IXが重要である可能性を支持し、乳癌マーカーおよび治療標的としてのCA IXの重要性を示す。

#### 【0091】

CA IXの異所性発現とHER-2/neu/c-erbB-2の過剰発現との間の有意な関連をここに開示する。HER-2/neu/c-erbB-2高発現と関連する特性の一部、たとえば浸潤および転移能力も

10

20

30

40

50

また、CA IXの同時発現によって媒介される可能性がある。

【0092】

Her-2/neu/c-erbB-2陽性癌の相当な割合が、Her-2/neu/c-erbB-2に対するヒト化モノクローナル抗体であるハーセプチンによる治療に反応しない(Kuter,1.2001)。同時発現したCA IXの阻害剤は、代替の治療手法を提供できる。そのような阻害剤は、たとえば、免疫反応性断片を含むポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗体、単一または二重特異性変異体、および関連する抗-抗イディオタイプ抗体を含む。これらの抗体変異体およびその断片のそれぞれは、単独でおよび/または細胞毒性物質と結合させて用いることができる。(たとえば、Zavada et al., 米国特許第5,955,075号(Sept.21,1999)および第6,051,226号(April18,2000)明細書、および Zavada et al. 欧州特許第0637836号(July7,1999)明細書を参照)。

10

【0093】

CA IX阻害剤の別の分類は、炭酸脱水酵素(CA)阻害剤である。(たとえば、Chegwiddden et al. (2000); Hockel and Vaupel (2001) (April 2001) (Feb. 21,2001); Supuran and Scozzafava (2002); Teicher et al. (1993)および Maren, T. H. (1995)を参照)。CA活性の阻害は、一部の腫瘍細胞株の浸潤を減少させることが示されており(Parkkila et al. (2000))、CA阻害剤治療は動物モデルにおいて化学治療薬と相乗効果を示し、癌化学療法への付加として有益であろう(Teicher (1993); Parkkila (2000))。CA阻害剤、たとえばアセタゾラミドまたはスルホンアミド類は、それぞれ腫瘍の浸潤性を低下させるかまたは腫瘍増殖を阻害することが示されている(Parkkila et al. (2000); Supuran et al., (2001))。さらに、CAアイソザイム拮抗作用が、白金製剤を含むさまざまな化学治療薬の細胞毒性効果を増強することが観察されている(Teicher et al. (1993))。

20

古典的な、临床上重要なCA阻害剤は芳香族/複素環式スルホンアミド類である。典型的なのは、アセタゾラミド、メタゾラミド、エトキシゾラミド、ジクロロフェナミド、ドルゾラミド、およびプリンゾラミドである。たとえば水溶性といった、目的の薬理的/生理化学的展望を強化するための多数の誘導体が新しく開発されている(Supuran and Scozzafava (2002))。

低酸素と治療

腫瘍低酸素は、腫瘍中で発達するまとまりのない無秩序な血管ネットワークが原因である血中酸素の不適切な供給の結果として生じる(Hockel and Vaupel (2001))。低酸素性細胞は放射線耐性であるため、腫瘍低酸素は治療上の問題を提示すると考えられてきており(Gray et al. (1953); Hall, E. J. (1988))、近年の診療所における腫瘍酸素供給の測定は放射線治療の結果と明らかな相関を示している(Hockel et al. (1993); Nordmark et al. (1996); Brizel et al. (1997); Fyles et al. (1998); Sundfor et al. (2000))。放射線治療の結果についての腫瘍低酸素の役割はあまり明らかでないが、低酸素が重要であるいくつかの理由がある。たとえば、プレオマイシンのような薬物は毒性であるためには絶対的に酸素を必要とする。慢性的に低酸素である細胞は、周期から外れ、細胞周期相に特異的な薬物に耐性である傾向がある。最後に、低酸素性細胞は機能する毛細血管から遠くに位置するため、多数の化学治療薬が、毒性となるのに十分な濃度でその距離を拡散するのは極めて困難である(Jain et al. (2000))。

30

40

低酸素は、結果としてより悪性な表現型を生じる細胞変化の原因になり得ることを、臨床観察が示唆している。(Hockel and Vaupel (2001))。

そのような低酸素関連悪性進行は、局所浸潤性および転移性伝播の可能性を高める結果となる(Brizel et al. (1996)、Hockey et al. (1996) Sundfor et al. (1998))。実験系からの結果は、これらの変化は実際に低酸素に媒介されるという概念を支持する(Young et al. (1988)、Graeber et al. (1996))。

低酸素性細胞に対するアジュバント治療に反応する可能性が非常に高い患者を特定する必要がある。そのような治療的手法は、カルボジェンのような腫瘍酸素供給を改善する方法(Powell et al. (1997))、生体内還元剤の使用(Strafford and Workman (1998))、または低酸素媒介性遺伝子治療手法(Dachs et al. (1997))を含むことができる。現

50

在、腫瘍酸素供給を測定するためにもっとも広汎に用いられている方法は、エッペンドルフ・ポーラログラフィー酸素電極である (Kallinowski et al. (1990))。しかし、それは侵襲性であって、また相対的に表在性の腫瘍にしか使用することができないため、用途は限られている。にもかかわらず、 $pO_2$  測定のこの方法は、多くの治療的相関を生み出ししており、低酸素測定の後発の方法はどれも、本法と比較されなければならない。

生体内還元剤マーカーは、腫瘍低酸素の濃度および程度を評価する代替手法を提供する。これは、2-ニトロイミダゾールであるミソニダゾールを用いたChapmanと共同研究者によって最初に示された (総説はChapman(1991)を参照)。ピモニダゾール (Raleigh et al. (1998))、EF-5 (Koch et al. (1995))、NITP (Hodgkiss et al. (1997))、およびSR 4554 (Aboagye et al. (1998)) といった関連化合物がその後開発されている。それらはすべて構造的に類似しており、細胞が放射線に耐性になることが知られている酸素供給の細胞内レベルを検出する (たとえば、Evans et al. (1996)を参照)。ピモニダゾールは臨床評価の最も進んだ段階にあり (Kennedy et al. (1997); Varia et al. (1998))、最近 $pO_2$ のエッペンドルフ測定と子宮頸部癌におけるピモニダゾール付加の形成の程度との間の臨床比較試験が行われている (Nordsmark et al. (2001))。この後者の試験では、 $pO_2$ の測定値が相対的に高い腫瘍がより低いピモニダゾール結合を示す傾向があったが、しかし、低酸素のこれらの2つの分析法の間には有意な相関は見られなかった。

ヒト腫瘍における低酸素の存在を評価する別の方法は、低酸素に媒介される遺伝子発現現象を利用することである。低酸素におけるさまざまな遺伝子のアップレギュレーションは、転写因子HIF-1(低酸素誘導性因子-1)の活性化によって媒介される。HIF-1タンパク質は低酸素性条件下で安定化され、エリスロポエチン (Maxwell et al. (1993))、VEGF (Forsythe et al. (1996))、GLUT-1 (Ebert et al. (1995))、およびCA IX (Wyckoff et al. (2000))を含む遺伝子の、プロモーター領域中に存在する遺伝子エンハンサー配列 (HREs, 低酸素応答配列) に結合する。ヒト腫瘍におけるこれらの遺伝子の発現は、腫瘍生検の時点で測定でき、したがって腫瘍低酸素測定の安価で侵襲が最小限である方法を提供し得る可能性がある。検証されれば、この手法は臨床試験のさまざまな治療選択肢についての患者の合理的な選択を助け、低酸素性細胞に向けられた治療戦略の適当な使用を可能にする。

#### 【0094】

近年、GLUT-1(グルコース輸送体-1)およびCA IX(炭酸脱水酵素IX)の発現が子宮頸部癌で測定され、 $pO_2$ のエッペンドルフ測定と相関づけられており、これらの免疫組織化学測定が今度はまた治療結果と関連づけられてもいる (Airley et al. (2001); Loncster et al. (2001))。Airley et al.(2002)で報告された通り、低酸素に調節される遺伝子GLUT-1とCA9の発現を、子宮頸部癌のピモニダゾール付加の存在と関連づける研究が行われた。

#### 【0095】

CA IXは、CAXIIと共に、VHL欠損細胞株におけるその過剰発現のために最初は低酸素誘導性遺伝子として特徴づけられたが、二酸化炭素の炭酸への可逆的水和反応を触媒し、腫瘍中のpHを調節する手段を提供する (Wyckoff et al. (2000))。CA IXはしたがって、腫瘍の酸素欠乏領域で見られる細胞内酸性条件を相殺するのを助ける作用をする可能性がある。これらの酸性条件は、ある程度、Glut-1の低酸素媒介性過剰発現によって促進されており、代わりに嫌氣的解糖を増加させる。子宮頸部の進行癌における低酸素のマーカーとしてのCA IXの最初の検証は (Loncster et al.(2001))、この酵素の存在を、乳癌 (Chia et al. (2001))、非小細胞肺癌 (Giatromanolaki et al. (2001))、および頭部および頸部癌 (Koukourakis et al. (2001)) における悪い予後と関連づけるさまざまな研究を伴っている。

Airley et al. (2002)の研究は、Glut-1およびCA IXのような低酸素に調節される膜タンパク質を、腫瘍中の低酸素の存在を推測するために臨床的に使用できるという証拠がさらに提供されたと結論づけ、これは生体内還元化学療法および/または低酸素調節性遺伝子治療といった新規様式の合理的な使用を可能にする。

Airley et al., Brit. J. Cancer, 86(Suppl.1):S13-S33(2002)は次のように述べている：「低酸素性細胞は放射線耐性および化学療法耐性であることが知られており、したがって、代理となる信頼できる低酸素のマーカーは、放射線療法または、生体内還元剤の使用のような低酸素指向性療法を用いた治療を合理的に使用することができることを確実にするのが望ましい。近年、HIF-1-に調節されるタンパク質であるGlut-1およびCA IXが低酸素の内因性マーカーとして、急性および慢性低酸素の両方を測定すると信じられているエッペンドルフ酸素電極を用いて測定した $pO_2$ との比較によって検証された。」

Swinson et al., Br. J. Cancer. 86 (Supp. 1):S13(2002)は次のように述べている：「活性化された上皮増殖因子受容体(EGFR)の存在およびHER2受容は、HIF-1の合成を増加させおよび転写活性を増大させることによって、細胞の低酸素性応答を増強すると仮定されている... (Laughner et al.(2001)を引用)。HIF-1転写因子はCA IXおよび、細胞pHホメオスタシスに關与する他の酵素、および血管内皮増殖因子(VEGF)およびグルコース輸送体-1のように嫌気代謝に關与する酵素をアップレギュレートする。」

Swinson et al., J. Clin.Oncol. 21(3):473-82(Feb.1,2003)はCA IXを低酸素マーカーとして、および非小細胞肺癌(NSCLC)におけるその予後診断的意義を評価した。M75を用いた標準的免疫組織化学(IHC)技術を使用して、175例の腫瘍切除されたNSCLC症例に由来する腫瘍切片を試験した。膜性(m)CA IX( $P=0.005$ )、細胞質(c)( $p=0.018$ )および間質性CA IX( $p<0.001$ )発現は腫瘍壊死(TN)の程度と相関した。核周囲性(p)CAIX( $p=0.035$ )は不十分な予測を伴った。Swinson et al. は、mCA IXは腫瘍細胞低酸素のマーカーであり、またpCA IXは悪性表現型の代表であると結論づけた。微細血管付近にCA IX染色が存在しないことは、組織が相対的に良く酸素供給されていることを示す。

Vaupel and Hoeckel, "Predictive power of the Tumor Oxygenation status, "Advances in Experimental Medicine and Biology, 471: 533-539 (2000) は、腫瘍低酸素は放射線による完全治癒の可能性の低下を示すだけでなく、一般に疾患の悪性進行を伴うことを指摘している。これまでのところ、腫瘍低酸素と、治療に対する抵抗性および腫瘍転移の観点からの臨床的悪性度とは相互に關係することをデータは示している。

【0096】

#### 抗癌剤およびMNタンパク質の受容体分子との相互作用を遮断する抗体

MNタンパク質は、下記を含むいくつかの理由から、癌治療の比類無く適切な標的であると考えられている。(1)MNタンパク質は細胞表面に局在し、接近可能になっている。(2)それはヒト癌(たとえば、とりわけ、子宮頸部、腎、大腸、乳房、食道、肺、頭部および頸部癌)の高い割合で発現されているが、そのような癌が生じる正常組織では通常何らかの意義のある程度には発現されていない。(3)MNタンパク質は通常、胃粘膜および消化管の一部の上皮(膀胱および小腸の上皮)にだけ発現されている。したがって、MN発現新生物発生前/新生物性組織とMN発現正常組織との間には解剖学的バリアが存在する。薬物は、抗体を含め、したがって投与することができ、MN発現正常組織に干渉することなく腫瘍に到達することができる。(4)MAbM75はMNタンパク質に対する高い親和性および特異性を有する。(5)タンパク質コード配列および遺伝子調節配列を包含するMNcDNAおよびMNゲノムクローンが単離されている。(6)MN-特異的抗体は、動物実験においておよび腎癌患者での第I相臨床試験においてMN-特異的キメラ抗体G250について示されたように、固形腫瘍において抗癌抗体を用いた臨床試験で報告された腫瘍取り込みが最高である部類であることが示されている (Steffens et al., J. Clin. Oncol., 15: 1529 (1997))。また、MN-特異的抗体は正常組織において取り込みが低い。

【0097】

Zavada et al., 国際公開第00/24913号に示されたデータは、正常組織で、および新生物発生前/新生物性組織でのMNタンパク質の挙動に関する下記の理論と合致する。In正常組織では(たとえば胃粘膜では)、MNタンパク質は分化因子であると考えられている。MNタンパク質はその正常受容体S (Stomach(胃)の)と結合する。胃癌はMNタンパク質を含まないことが示されている。

【0098】

10

20

30

40

50

他の組織におけるMNタンパク質の異所性発現は、細胞の悪性変換を引き起こす。そのような異所性発現は、悪性に繋がるシグナル伝達経路と連動した代替の受容体H(HeLa細胞の)とのMNタンパク質の結合によって引き起こされると考えられている。受容体Hに対するMNタンパク質の結合部位を遮断する薬物または抗体は、新生物発生前/新生物性細胞の正常への復帰を引き起こすかまたはその死を誘導すると予測される。

【0099】

#### MN-遮断剤または抗体の設計および開発

MN-遮断剤、たとえばMNタンパク質との高い親和性を有するペプチド、または抗体を設計および開発する過程は、いくつかの段階を有する。最初は、国際公開第00/24913号(Zavada et al.)に記載の通り、MNタンパク質の受容体への結合について細胞接着分析に基づいて試験することである。その同じプロトコールは、MNタンパク質結合部位を遮断する薬物についての分析にも用いられる。選択的な受容体SおよびHを考慮して、胃上皮細胞または復帰突然変異株(優先的にS受容体を含む)、HeLa細胞(H受容体を含みS受容体を欠く)が細胞接着分析に用いられる。

【0100】

MNタンパク質の受容体結合部位を特定するために、さまざまなドメインを欠くMNタンパク質の欠失変異体を用いて、MNタンパク質の受容体との相互作用を担う領域を特定することができる。好ましいMN結合部位は、CA IXのN末端PG領域で4回同一に反復されているアミノ酸配列PGEEDLP(配列番号11)、または少なくともMNタンパク質のプロテオグリカン様ドメイン中の図1A-1Cに示す通りのアミノ酸(aa)61-96(配列番号12)の6アミノ酸の6回タンデムリピート内の近縁のコピーのように、MabM75に対するエピトープと近縁であるかまたは同一であると考えられている。その関連ドメイン内でより小さな欠失変異体を作製することができる。たとえば、MNタンパク質の小さい断片だけを有する融合タンパク質を作製することができる。また、特定のプロテアーゼを用いたMNタンパク質の制御された消化後に産物の分離を行うことができる。

【0101】

さらに、予想結合部位を含むペプチドを合成することができる。これらすべての産物は、細胞接着分析法で、下記に例示する通り試験することができる。たとえば、Pierschbacher and Ruoslahti, PNAS, 81: 5985 (1984); Ruoslahti and Pierschbacher, Science, 238: 491を参照)。

MN受容体結合部位を遮断するように分子を構築することができる。たとえば、国際公開第0/24913号(Zavada et al.)の実施例2および3に例示された通りの、ファージディスプレイペプチドライブラリーキット(New England Biolabs; 米国マサチューセッツ州ビバリー(Beverly)、のPh.D(登録商標)-7 Peptide 7-Mer Library Kitのような)の用途を用いて、標的分子に対して高い親和性を有するペプチドを発見することができる。特定されたペプチドの生物学的活性は、MNタンパク質への細胞接着の阻害によって、MN関連腫瘍細胞(HeLa)のおよび対照細胞の細胞形態および増殖の特徴に及ぼす効果によって、in vitro で試験される(Symington, J.Biol.Chem. 267: 25744 (1992))。In vivoスクリーニングは、HeLa細胞を注射されているヌードマウスで実施する。

【0102】

MNタンパク質の結合部位を含むペプチドが調製される(たとえばMAPs(複数抗原ペプチド); Tam, J. P., PNAS (USA) 85: 5409 (1988); Butz et al., Peptide Res., 7: 20 (1994))。MAPsは、結合部位を認識し遮断する抗体(ポリクローナルおよび/またはモノクローナル)を得るために動物を免疫するのに用いられる。たとえば、Brooks et al., Cell 79: 1157 (1994)を参照)。「ワクチン接種」をその後用いて、動物における保護を試験する。MN結合部位に対する抗体は、MNタンパク質の他の分子との相互作用を遮断するのに用いることができる可能性がある。

コンピューター・モデリングを用いて、MNタンパク質とその受容体との間の立体的阻害を媒介する、MNタンパク質に対して特異的親和性を有する分子を設計することもできる。受容体に対するMN結合部位のコンピューターモデルは、この構造の空間的、静電的、疎水

10

20

30

40

50

的およびその他の特徴を含む構造に対して相補的な、結合部位に最も適合する有機分子が設計される。MN結合部位を遮断することができる無機分子もまた同様に試験することができる。

#### 【0103】

新規癌治療薬を開発するための標的としての癌蛋白の用途は、当業者には従来のものと考えられている。たとえば、Mendelsohn and Lippman, "Growth Factor," pp. 114-133, IN: DeVita et al. (eds.), Cancer: Principles and Practice of Oncology (4th Ed.; Lippincott; Philadelphia, 1993) を参照)。非常に広い意味で、遮断剤の設計は競合阻害実験に基づくことができる。スルホンアミド類(葉酸の前駆体であるパラアミノ安息香酸の競合阻害剤)の発見以来、そのような実験が薬物の発明に用いられている。また、一部の細胞増殖抑制剤は競合阻害剤である(たとえば、中でも、ハロゲン化ピリミジン類)。

10

#### 【0104】

しかし、そのような手法のMNへの適用は新規である。他の腫瘍関連分子(たとえば増殖因子およびそれらの受容体)と比較して、MNは、新生物発生前/新生物性組織と正常組織とで発現に差があるという特有の性質があり、それらの組織は解剖学的バリアで分けられている。

#### 【0105】

##### 他のCA IX検出方法

診断的核酸は、当該分野で既知の方法によって、直接にまたは間接に標識することができる、また従来のサザンまたはノーザンハイブリダイゼーション分析に用いることができる。そのような分析法は、形質転換株の同定または、in vitro 診断で、たとえばMNmRNAを組織中に発癌活性の指標として検出するのに用いることができる。MNmRNAまたはその前駆体の存在は大部分の組織について発癌活性の指標となり、一方、胃および膀胱組織においてMNmRNAが存在しないかまたは、対応する正常組織で見られるmRNAのレベルと比較してレベルが低下していることは、発癌活性の指標と考えられている。MNタンパク質をコードするDNAは、中でも、化学合成によって、胎盤または他の細胞由来のmRNAの逆転写産物をスクリーニングすることによって、または、真核細胞由来のゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって得ることができる。

20

#### 【0106】

MN-特異的抗体は、血液、血漿、血清、リンパ液、粘液、涙液、尿、脊髄液、および唾液といった体液の試料中の血清学的に活性であるMNタンパク質/ポリペプチドによって結合することができる;しかし、そのような抗体はごく普通には血液、血漿、および血清中に、好ましくは血清中に見出される。MN抗原およびそれと反応するMN-特異的抗体を検出および/または定量する分析法から得られた結果の相関は、患者の疾患状態の好ましいプロフィールを提供する。

30

MN抗原または抗体の存在は、いくつかの明確な診断的分析法を用いて検出および/または定量することができる。当業者は、MN抗原および/または抗体検出および/または定量するための任意の従来のイムノアッセイ形式を当てはめることができる。

#### 【0107】

MN抗原およびMN-特異的抗体の検出のための多数の形式を、もちろん利用することができる。それらは、診断産業で一般に用いられる分析法の中でも、ウェスタンブロット、ELISAs、RIAs、競合EIA、または二抗体サンドイッチアッセイ、免疫組織化学染色、であることができる。そのようなイムノアッセイでは、結果の解釈は、抗体または抗体の組み合わせは、試料中に存在しMNとは無関係である他のタンパク質およびタンパク質断片とは交差反応しないという仮定に基づく。

40

#### 【0108】

MN抗原についてのELISA検査の一つの型の代表は、MNタンパク質/ポリペプチドに対して作製した抗体かまたはMNタンパク質を発現する全細胞に対して作製した抗体でマイクロタイタープレートを被覆し、これに患者試料、たとえば組織または細胞の抽出物を加える形

50

式である。抗原があれば抗体に結合させるインキュベーション期間後、プレートを洗浄し、酵素と結合した抗MN抗体の別の組を加え、インキュベーションして反応を起こさせ、プレートをその後再度洗浄する。その後、酵素基質をマイクロタイタープレートに加え、ある時間インキュベーションして酵素を基質に作用させ、最終調製物の吸着を測定する。吸収の大きな変化は、陽性結果を示す。

#### 【0109】

MNタンパク質および/またはポリペプチドは、患者の体液、組織および/または細胞中のMN抗原の存在を検出および/または定量するのに用いることができることもまた、イムノアッセイの当業者には明らかである。そのような一実施形態では、MNタンパク質/ポリペプチドを標識し、体液を加えてMNタンパク質/ポリペプチドに特異的な抗体への標識MNタンパク質/ポリペプチドの結合と競合させる、競合イムノアッセイが用いられる。

10

別の一実施形態では、MNタンパク質またはポリペプチドに対して作製された標識抗体を用いる、免疫測定法を用いることができる。そのような分析法では、抗原結合抗体と複合体を形成する標識抗体の量は、試料中のMN抗原の量と正比例する。

MN-特異的抗体を検出するための代表的分析法は、たとえば、MNタンパク質/ポリペプチドを認識するモノクローナル抗体と組み合わせ、標識MNタンパク質/ポリペプチドが試料中の抗体によって沈降させられる凶暴分析である。当業者は、MN-特異的抗体を検出および/または定量するための任意の従来のイムノアッセイ形式を当てはめることができる。前記MNタンパク質/ポリペプチドへの前記抗体の結合の検出は、たとえばヒトでは抗ヒト標識IgGを使用するといった、当業者に既知の多数の方法によることができる。

20

#### 【0110】

脊椎動物試料中のMN抗原を検出および/または定量するための本発明の典型的なイムノアッセイ法は下記の工程を含む：

- a) 前記脊椎動物試料を、一つの組が標識されているかまたは他の方法によって検出可能である、MN抗原と結合する抗体の一種類以上の組（一種類または複数種類の抗体）とインキュベーションする；
- b) インキュベーションした試料を、MN抗原および前記抗体を含む免疫複合体の存在について調べる。

#### 【0111】

本発明に記載の別の典型的イムノアッセイ法は、競合イムノアッセイを用いて脊椎動物試料のMN抗原を検出および/または定量するものであり、また、前記方法は下記の工程を含む：

30

- a) 脊椎動物試料を一種類以上の組のMN-特異的抗体およびある量の標識化またはその他の方法によって検出可能なMNタンパク質/ポリペプチドとインキュベーションする、ここで前記MNタンパク質/ポリペプチドは前記抗体への結合について試料中に存在するMN抗原と競合する；
- b) インキュベーションした試料を検討し、前記抗体と結合した標識/検出可能なMNタンパク質/ポリペプチドの量を測定する；および
- c) 工程b)の検討の結果から、MN抗原が前記試料中に存在するかどうか、および/または前記試料中に存在するMN抗原の量を判定する。

40

#### 【0112】

適切な特異性を有する抗体(生物学的に活性である抗体断片を含む)がいったん調製されれば、幅広い免疫学的分析法を利用して、特異的抗体-抗原複合体の形成を測定することができる。数々の競合および非競合タンパク質結合分析法が科学文献および特許文献に記載されており、そのような分析法の多数が市販されている。血清抗原の検出に適切である典型的なイムノアッセイは、米国特許第3,984,533号；第3,996,345号；第4,034,074号；および第4,098,876号明細書に記載されたものを含む。

#### 【0113】

分析に用いる抗体は標識されていても標識されていなくてもよい。非標識抗体は凝集に用いることができる；標識抗体は、幅広い標識を使用して、幅広い分析法に用いることが

50



できる。

#### 【0114】

適切な検出手段は、放射性ヌクレオチド、酵素、補酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤、酵素基質、またはコファクターのような標識、酵素阻害剤、フリーラジカル、微粒子、色素、などを含む。そのような標識試薬は、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ、たとえばELISA、蛍光イムノアッセイ、などといったさまざまなよく知られた分析法で用いることができる。たとえば、米国特許第3,766,162号；第3,791,932号；第3,817,837号；および第4,233,402号明細書を参照。

#### イムノアッセイ検査キット

上記に概説した分析法は、MN抗原および/またはMN-特異的抗体(生物学的に活性である抗体断片を含む)を検出および/または定量するための検査キットに具体化することができる。MN抗原を検出および/または定量するためのキットは、MNタンパク質/ポリペプチドおよび/または、ポリクローナルおよび/またはモノクローナルであるMN-特異的抗体を含むことができる。そのような診断/予後診断検査キットは一種類以上の組のポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗体をサンドイッチ形式のために含むことができ、ここで抗体はMN抗原上のエピトープを認識し、一つの組は適当に標識されているかまたは他の方法で検出可能である。

#### 【0115】

標識された(または他の方法で検出可能な)MNタンパク質/ポリペプチドと試料中のMN抗原との間で抗体への結合について競合が存在する分析形式のための検査キットは、最適な感受性および精度を与える量での標識タンパク質/ポリペプチドと抗体の組み合わせを含むことができる。

#### 【0116】

MN-特異的抗体のための検査キットは、好ましくは標識化/検出可能なMNタンパク質および/またはポリペプチドを含み、また必要に応じて、対照、緩衝液、希釈液、および界面活性剤といった他の構成成分を含むことができる。そのような検査キットは、従来の分析法のための他の適当な形式を有することができる。

#### 【0117】

酵素-イムノアッセイでの用途のためのキットは典型的には、酵素標識試薬および酵素のための基質を含む。その酵素を、たとえば、本発明のMN-特異的抗体かまたはそのようなMN-特異的抗体に対する抗体のいずれかと結合させてよい。

#### 【0118】

#### MN-特異的抗体の調製

「抗体」の語は、ここでは抗体全体だけでなく抗体の生物学的に活性である断片、好ましくは抗原結合領域を含む断片も含むと定義される。さらにMNタンパク質および別の組織-特異的抗原に特異的である二重特異性抗体も抗体の定義に含まれる。

#### 【0119】

本発明の抗体は、従来の方法論によっておよび/または遺伝子工学によって調製することができる。抗原性を減少させるためにヒト化したキメラ抗体はin vivo用途に好ましい。抗体断片は、好ましくは超可変領域を含む軽鎖および/または重鎖( $V_H$ および $V_L$ )の可変領域から、およびさらにより好ましくは $V_H$ および $V_L$ 領域の両方から遺伝子組み換えすることができる。たとえば、ここで用いられる「抗体」の語は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体ならびにその生物学的に活性である断片を包含し、他の可能性の中でも、「一価」抗体(Glennie et al., Nature, 295: 712(1982)); 共有結合的にまたは非共有結合的に凝集していても、Fab'および $F(ab')_2$ 断片を含むFabタンパク質; 軽鎖または重鎖単独、好ましくは重鎖および軽鎖の可変領域( $V_H$ および $V_L$ 領域)、およびより好ましくは超可変領域(前記 $V_H$ および $V_L$ 領域の相補性決定領域(CDRs)ともいう)を含む; Fcタンパク質; 一種類より多い抗原に結合する能力のある「ハイブリッド」抗体; 定常-可変領域キメラ; 異なる起源の重鎖と軽鎖を有する「複合」免疫グロブリン; 標準的組み換え技術によって、またはオリゴヌクレオチド指向性突然変異誘発技術によって調製された、特異性およびそ

10

20

30

40

50

他の特性が改良された「改変」抗体 (Dalbadie-McFarland et al., PNAS (USA)、79: 6409 (1982)) を含む。

#### 二重特異性抗体

二重特異性抗体は二種類の目的の特異性の抗体を化学的に結合させることによって作製することができる。二重特異性MAbsは、好ましくは2種類のハイブリドーマの体細胞ハイブリダイゼーションによって生じることができる。MNタンパク質ともう一つの抗原を標的とする二重特異性MAbsは、MN-特異的MAbsを産生するハイブリドーマを他の抗原に特異的なMAbsを産生するハイブリドーマと融合することによって産生することができる。たとえば、MN-特異的 MAbを産生するハイブリドーマと抗細胞障害性細胞抗体を産生するハイブリドーマとの融合によって形成された細胞(クアドローマ)は、親抗体の特異性を有するハイブリッド抗体を産生する。(たとえば、Immunol. Rev. (1979); Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol., 41: 793 (1977); van Dijk et al., Int. J. Cancer, 43: 344-349(1989)を参照)。このように、MN-特異的MAbを産生するハイブリドーマを、たとえば抗T3抗体を産生するハイブリドーマと融合し、細胞障害性T細胞をMN発現腫瘍細胞にターゲティングすることができるMN/T3二重特異性抗体を産生する細胞株を得ることができる。

10

#### 【0120】

治療的および/または画像処理用途には、抗体が生物学的に活性である抗体断片、好ましくは遺伝子操作された断片、より好ましくはV<sub>H</sub>および/またはV<sub>L</sub>領域から遺伝子操作された断片であることが好ましく、さらにより好ましくはその超可変領域を含む。しかし、一部の治療的用途には、MNタンパク質および細胞障害性細胞をターゲティングする二重特異性抗体が好ましい。

20

#### 【0121】

イムノアッセイの分野でよく知られた、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を作製する従来技術がある。MN-特異的抗体を作製するための免疫原は、中でも、好ましくは精製された、MNタンパク質および/またはポリペプチドおよびMX感染腫瘍細胞株、たとえばMX感染HeLa細胞を含む。

抗ペプチド抗体は、欧州特許第44,710号(1982年1月27日公開)に記載されているように、本分野の従来法によっても作製される。要約すると、そのような抗ペプチド抗体は、図1からのようなMNアミノ酸配列からペプチドを選択し、化学的にそれを合成し、それを適当な免疫原性タンパク質と結合し、それを適当な動物、通常はウサギまたはマウスに注射することによって作製される;このように、ポリクローナルまたはモノクローナルのいずれかの抗体が作製され、後者はたとえばKohler-Milstein法による。

30

#### 【0122】

従来のハイブリドーマ技術に加えて、より新しい技術を用いて本発明の抗体を作製することができる。たとえば、抗体V-遺伝子をクローニングし発現するためのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の使用、および結合活性を有する断片をコードする抗体遺伝子を選択するためのファージディスプレイ技術の結果として、免疫したマウスまたはヒトを用いて、PCR増幅したV-遺伝子のレパートリーから抗体断片が単離されている。(参考Marks et al., BioTechnology, 10: 779 (July 1992); Chiang et al., BioTechniques, 7 (4): 360 (1989); Ward et al., Nature, 341: 544 (Oct. 12, 1989); Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991); Clackson et al., Nature, 352: (15 August 1991); and Mullina et al., PNAS (米国)、87: 8095 (Oct. 1990))。

40

組み換え技術による抗体調製の詳細は、抗体の語はここでは生物学的に活性である抗体断片を含むと定義されるが、米国特許第4,816,567号(1989年3月28日に発行);欧州特許第338,745号(1989年10月25日公開);欧州特許第368,684号(1990年6月16日公開);欧州特許出願第239,400号(1987年9月30日公開);国際公開第90/14424号(1990年11月29日公開);国際公開第90/14430号(1990年5月16日公開); Huse et al., Science, 246: 1275 (Dec. 8, 1989); Marks et al., BioTechnology, 10: 779 (July 1992); La Sastry et al., PNAS (USA)、86: 5728 (August 1989); Chiang et al., BioTechniques, 7 (40

50

) : 360 (1989); Orlandi et al., PNAS (USA)、86 : 3833 (May 1989); Ward et al. Nature, 341 : 544 (October 12, 1989); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581 (1991); および Hoogenboom et al., Nucleic Acids Res., 19 (15): 4133 (1991) に見ることができる。。

#### 代表的Mabs

本発明の分析法における用途のためのモノクローナル抗体は、たとえば、Galfre and Milstein, "Preparation of Monoclonal Antibodies: Strategies and Procedures," in Methods in Enzymology: Immunochemical Techniques. 73: 1-46 (Langone and Vanatis (eds); Academic Press(1981)) ; および古典的文献Milstein and Kohler, Nature. 256 : 495-497 (1975) ) の方法といった当該分野でよく知られた方法によって得ることができる。

10

#### 【0123】

本発明の代表的ハイブリドーマはマウス細胞株の融合によって作製されているが、可能性の中でも、ヒト/ヒトハイブリドーマ (Olsson et al., PNAS (USA)、77: 5429 (1980)) およびヒト/マウスハイブリドーマ (Schlom et al., PNAS (USA)、77: 6841 (1980); Shearman et al. J. Immunol. 146: 928-935 (1991); および Gorman et al., PNAS (USA)、88 : 4181-4185 (1991) ) もまた作製することができる。そのようなヒト化モノクローナル抗体は、治療的および画像処理用途に好ましいモノクローナル抗体である。

#### 【0124】

本発明に規定のモノクローナル抗体は、適当な哺乳類、好ましくは齧歯類、より好ましくはウサギまたはマウスを、たとえば、MaTu感染HeLa細胞、MN融合タンパク質、または必要に応じて担体タンパク質に結合したMNタンパク質/ポリペプチドといった、適当な免疫原を用いて免疫することによって作製することができる。本発明の抗体を作製する典型的な方法を下に記載する。

20

MNタンパク質/ポリペプチドを検出するのに有用な本発明に記載のモノクローナル抗体は、標識の中でも、たとえば、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)のような酵素、蛍光化合物、または、 $^{125}\text{I}$ のような放射性同位体を用いて、任意の従来の方法で標識することができる。本発明に記載の好ましい標識は $^{125}\text{I}$ であり、また抗体を標識化する好ましい方法は、クロラミン-Tを用いることによる (Hunter, W.M., "Radioimmunoassay," In : Handbook of Experimental Immunology, pp. 14.1-14.40 (D. W. Weir ed.; Blackwell, Oxford/London/Edinburgh/Melbourne; 1978) ) 。

30

本発明の代表的mabsは、下記のMabsM75、MN9、MN12およびMN7を含む。本発明のモノクローナル抗体は、MN タンパク質/ポリペプチドをさまざまな診断的臨床検査で、たとえば腫瘍細胞培養中に、または臨床試料中に検出するのに用いられる。

#### エピトープ

エピトープを含むペプチドに対するMABの親和性は、たとえば、ペプチドが短い配列(4-6aa)であるかどうか、またはそのような短いペプチドの片側または両側により長いaa配列が隣接しているかどうか、またはエピトープについての試験においてペプチドが溶液中に存在するかまたは表面上に固定化されているか、といった状況によって変わる。したがって、MN-特異的MABsに対するここに記載の代表的エピトープはMABsの用途の状況によって変化することが当業者には予測される。

40

#### 【0125】

#### エピトープマッピング

エピトープマッピングを、Novagen, Inc. から市販されているキットであるNovatopeシステムによって実施した。類似例についてはLi et al., Nature. 363: 85-88 (6 May 1993) を参照)。要約すると、MNCDNAを切断して約60塩基対の重複する短い断片とした。断片をE. coliで発現させ、E. coliコロニーをニトロセルロース膜上に移し、溶菌して目的のmabを用いてプロービングした。目的のmabと反応するクローンのMNCDNAを配列決定し、各mabと反応することがわかった重複するポリペプチドからそのmabのエピトープを推測した。

50

## 【 0 1 2 6 】

MN-特異的抗体の治療的用途

本発明の、モノクローナルおよび/またはポリクローナル、好ましくはモノクローナルである、上記に概説したMN-特異的抗体は、新生物性および/または前新生物性疾患の治療において、単独で、または化学治療薬またはリシンAのような毒性物質と組み合わせて、治療的に使用することができる。

## 【 0 1 2 7 】

治療的用途にさらに好ましいのは、ここに記載する通りの生物学的に活性である抗体断片である。またそのような治療的用途に好ましいMN-特異的抗体は、ヒト化モノクローナル抗体および/または二重特異性抗体である。

10

## 【 0 1 2 8 】

MN-特異的抗体は、治療的に有効な量で、好ましくは生理的に許容可能な無毒性の液体賦形剤中に分散して、新生物発生前/新生物性疾患に罹患した患者に投与することができる。MN-特異的抗体は、単独で、または抗腫瘍薬のキャリアーとして投与することができる。MN-特異的抗体と結合させることのできるさまざまな抗増殖性、抗新生物性または細胞毒性物質には、抗葉酸剤であるメトトレキサートのような代謝拮抗剤、またはプリンまたはピリミジンアナログであるメルカプトプリンおよびフルオロウラシルがある。その他、抗生物質、リシンおよびアブリンのようなレクチン、ジフテリア毒素のサブユニットのような毒素、<sup>211</sup>アスタチンおよび<sup>131</sup>ヨウ素のような放射性核種、ミサニダゾールのような放射線感受性増強物質、またはホウ素含有有機物のような中性子感受性増強物質を含む。そのような物質は、グルタルアルデヒド架橋のような従来技術によって抗体と結合することができる。

20

## 【 0 1 2 9 】

MN-特異的抗体は、標的細胞障害性細胞(たとえばヒトT細胞、単球、またはNK細胞)をターゲッティングするのに用いることができる。細胞障害性細胞は、MN-特異的抗体のFc部分と結合する細胞障害性細胞上のFc受容体を通じて、または二重特異性を有するブリッジング抗体、すなわちMNタンパク質に対しておよび細胞障害性細胞に対して特異的である二重特異性抗体を介して、MN発現腫瘍細胞に結合することができる。

## 【 0 1 3 0 】

細胞障害性細胞を、二重特異性抗体を細胞に結合させることによって標的とすることができる。標的とした後、細胞を患者に投与することができる。標的とされた細胞を用いた治療は、外科治療、放射線治療、または化学療法への付加として用いることができる。

30

## 【 0 1 3 1 】

腫瘍ワクチンとしての抗イディオタイプMN-特異的抗体および免疫治療薬としての抗 - 抗イディオタイプ抗体血清

MN-特異的抗イディオタイプ抗体は、異常なMN発現を伴う新生物性疾患に対するワクチンとしての治療的有用性を有する。MN-特異的抗 - 抗イディオタイプ血清もまた、治療的抗腫瘍効果を有する。それらの治療的有用性は、MN-特異的G250MAb、およびその抗イディオタイプ抗体(Ab2)、およびさらに下記の研究によって実証された通り抗 - 抗イディオタイプ血清(Ab3)を用いて行われた研究によって実証される。

40

## 【 0 1 3 2 】

Uemura et al., Biotherapy (Japan) 10 (3): 241-244 (1996) (英文要約)は、抗イディオタイプ抗体(Ab2)を「免疫グロブリン分子の可変領域内に位置する抗原決定基に対する抗体と定義する。通常の抗原を模倣するAb2(いわゆる内部像Ab2)を、宿主のその通常の抗原に対して特異的な免疫系を誘発するために、ワクチン接種用の代理抗原として用いることができる。」

Uemura et al., 同上は、G250MAbに対する6種類の内部像マウスAb2s--NUH31、51、71、82(IgG1)およびNUH44(IgG2a)を以前に単離しており、腫瘍ワクチンとしてのモノクローナルAb2の用途を検討している。Uemura et al.は「RCC腫瘍関連-抗原関連イディオタイプワクチン接種が抗原特異的な体液性および細胞性応答を誘導したという以前の結果、RCC-

50

関連抗原...G250 (MN) を模倣するさまざまな内部像Ab2を用いて免疫したマウスから得られた抗 - 抗イディオタイプ抗体 (Ab3) 血清の抗癌効果...確立された小さなNU12ヒトRCC異種移植片 (G250+, 20mm<sup>3</sup>) を有し、2x10<sup>5</sup>SK-RC-52 (G250+) RCC細胞を皮下注射されたNu/nuBALB/cマウスを0.2mlのAb3血清の腹腔内注射によって処置した。この処置の結果、完全な腫瘍拒絶および対照群と比較して有意な腫瘍増殖阻害が生じた (p<0.01)。」を考慮して調査した。Uemura et al. は、「Ab2sを用いた免疫法は、正常免疫能の動物において強力な抗腫瘍効果を導く」と結論した。

#### 【 0 1 3 3 】

Uemura et al., J. Urol., 159 (5) (Suppl.) : Abstract 724 (May 1998) は、MNを腎細胞癌 (RCC) の免疫治療標的として記載している。MN-特異的MabG250の治療的可能性を、IFN/IL-2/MCSF (インターフェロン、インターロイキン-2、マクロファージコロニー刺激因子) およびAb2 (NUH82) 誘導マウス血清 (Ab3-82) と組み合わせて評価した。Ab2sは、MabG250に対して作製された、RCC用の腫瘍ワクチンとして有用であることが示されているモノクローナル抗イディオタイプ抗体である。

#### 【 0 1 3 4 】

Uemura et al., 同上は、NUR-2RCC異種移植片を有するマウスを、MabG250、および/またはサイトカイン、または、MCSFを含むかまたは含まない0.2mLのAb3血清の腫瘍周囲注射によって処置したことを報告した。MabG250で処置した動物の腫瘍体積は対照よりも有意に小さかった。IFNまたはIL-2処置は同様に有効であったが、MCSFは有意な腫瘍抑制の結果を生じなかった。IFN/IL-2/MabG250治療は、MabG250またはサイトカイン単独両方と比較して有意に抗腫瘍効果を増大させた。さらに、Ab3に基づく (Ab2誘導性) 免疫治療の結果、MabG250または他のサイトカイン併用療法と比較して、甚だしい単独療法腫瘍増殖阻害を生じた。

#### 【 0 1 3 5 】

MN-特異的細胞内発現抗体--細胞表面へのMNタンパク質の輸送を遮断するためのMN-特異的抗体の細胞内発現を介した標的化腫瘍死滅

抗体をコードする遺伝子は、抗原結合ドメインが細胞内で発現できるように操作することができる。小胞体管腔を標的としたそのような「細胞内発現抗体」は、細胞表面への細胞膜タンパク質の輸送を阻害する単純で効果的な機構を提供する。(Marasco, W. A., "Review--Intrabodies : turning the humoral immune system outside in or Intracellular immunization, "Gene Therapy, 4 : 11-15 (1997); Chen et al., "Intracellular Antibodies as a new class of therapeutic molecules for gene therapy," Hum. Gene Ther., 5 (5): 595-601 (1994) ; Mhashilkar et al., EMBO J., 14 : 1542-1551 (1995); Mhashilkar et al., J. Virol., 71: 6486-6494 (1997); Marasco (Ed.), Intrabodies : Basic Research and Clinical Gene Therapy Applications, (Springer Life Sciences 1998; ISBN 3-540-64151-3) (世界の研究所からの、細胞内発現抗体を用いた前臨床試験を要約); Zanetti and Capra (Eds.), "Intrabodies : From Antibody Genes to Intracellular Communication, "The Antibodies: Volume 4, (Harwood Academic Publishers ; ISBN 90-5702-559-0 (Dec. 1997)) ; Jones and Marasco, Advanced Drug Delivery Reviews, 31 (1-2): 153-170 (1998); Pumphrey and Marasco, Biodrugs. 9 (3): 179-185 (1998); Dachs et al., Oncology Res., 9 (6-7): 313-325 (1997); Rondon and Marasco, Ann. Rev. Microbiol., 51: 257-283 (1997)) ; Marasco, W. A., Immunotechnology, 1(1) : 1-19 (1995); and Richardson and Marasco, Trends in Biotechnology, 13 (8): 306-310 (1995))。

MN-特異的細胞内発現抗体は、MNタンパク質の成熟および細胞表面への輸送を阻害し、それによってMNタンパク質が発癌過程で機能するのを防ぐ可能性がある。MNのEC、TM、またはICドメインに対する抗体は、この点で有用である可能性がある。MNタンパク質はECドメインからIC尾部にシグナルを伝達することによって、およびその後細胞の内部にある他の細胞内タンパク質と結合することによって、シグナル伝達を媒介すると考えられている。MN-特異的細胞内発現抗体はこの結合を破壊しそのMN機能を混乱させることができる

。

MNタンパク質の機能を不活性化することは、形質転換されていない表現型への腫瘍細胞の復帰を結果として生じるであろう。(Marasco et al. (1997)、前出)。子宮頸癌細胞におけるMNCdNAのアンチセンス発現は、ここで実証されるように、MNタンパク質の欠損が遺伝子導入された細胞の増殖抑制に結びつくことを示している。細胞表面へのMNタンパク質輸送の障害が同様な結果を有することが同様に予想される。その予測を確認するためには、M75MAbの可変領域のクローニングおよび細胞内発現を試験すべきである。

## 【0136】

好ましくは、細胞内で産生されたMN-特異的抗体は、一本鎖抗体、具体的には一本鎖可変領域断片またはsFvであって、重鎖および軽鎖可変ドメインが単一のポリペプチドとして合成され、可塑性のリンカーペプチド、好ましくは(Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>(配列番号116)によって分けられる。

10

MN-特異的な細胞内で産生された抗体は、新生物発生前/新生物性疾患を治療するために、MNタンパク質を異常に発現している新生物発生前/新生物性細胞に、MN-特異的抗体可変領域断片をコードする核酸を含む、発現調節配列に調節可能に結合したベクターを遺伝子導入することによって治療的に用いることができる。好ましくは、前記発現調節配列はMN遺伝子プロモーターを含む。

MN発現腫瘍細胞を標的とするためにMN-特異的抗体またはペプチドを用いる抗体媒介遺伝子導入

DNAを密集化しその負電荷を中和することができるポリカチオンであるポリリジンと共有結合したMN-特異的抗体またはペプチドは、生物学的に活性であるDNAをMN発現腫瘍細胞に効率的に送達することが予想される。密集化したDNAが、MNプロモーターの調節下にあるHSVtk遺伝子を含む場合、その系はMN発現腫瘍細胞だけの認識および発現について二重に特異性を有する。密集したDNAはまた、CTL活性を誘導するサイトカイン、または他の生物学的に活性である分子をコードすることもできる。

20

## 【0137】

M75MAbは(または、たとえば、一本鎖抗体として、またはその可変領域として)、そのようなMN-特異的抗体の典型である。実施例5は、MNタンパク質のCAドメインの酵素中心に結合するヘプタペプチド(配列番号107-109)を開示し、そしてそのようなヘプタペプチドを含む選択されたペプチドまたはタンパク質もまた、MNタンパク質の細胞外ドメイン上の結合側と結合することが予想される。

30

## 【0138】

抗体の画像処理用途

さらに、本発明のMN-特異的抗体は、放射性核種のような造影剤と結合させた場合、画像処理に用いることができる。生物学的に活性である抗体断片またはヒト化モノクローナル抗体が画像用途に好ましいであろう。

## 【0139】

患者の新生物性組織は、たとえば、形質転換された幹細胞の部位、腫瘍の部位、および何らかの転移の位置として検出することができる。適当に標識したかまたは造影剤と結合した抗体を、生理的に許容可能な賦形剤に溶解して患者に注射することができ、抗体の結合は、標識または造影剤に適当な方法によって、たとえば、シンチグラフィによって検出することができる。G250MAbを用いた研究は典型的である。

40

Steffens et al., J. Urol., 159 (5)(Suppl.): Abstract 562 (May 1998)は、転移性RCCの患者における<sup>131</sup>I-cG250 MAbを用いた第I/II相試験を記載している。MAbcG250は、マウス免疫グロブリンの定常領域をヒト免疫グロブリン領域で置換したキメラMAbである。(Oosterwijk and Debruyne, World J. Urol., 13: 186 (1995))。原発性RCCにおけるcG250MAbの取り込みは、腫瘍組織グラム当たりの注射量(%ID/g)の0.52パーセントの高さだった。その試験は、「<sup>131</sup>I-cG250は放射線免疫治療の有望な候補であり、<sup>131</sup>I-cG250の安全性、最大耐量(MTD)および治療的潜在性を決定するため第I/II相活性用量段階増加試験を開始した。」と結論した。

50

## 【0140】

Bander et al., Proceedings Am.Urol.Assoc., 155 (Suppl.) : 583A (Abstract 1088) (May 1996) は、MN-特異的MAbG250を用いた腎癌画像処理を記載しており、MAbG250は腎癌患者の85-90%に存在するMNを検出するが、正常腎臓細胞上のMNは検出しない。Bander et al. は、患者48名が<sup>131</sup>I-G250MAbを用いた臨床試験に参加したと報告している。

## 【0141】

MN 遺伝子--クローニングおよび配列決定

図1A-Cは完全長MNcDNAクローンのヌクレオチド配列(配列番号1)を与える。図2A-Fは完全なMNゲノム配列(配列番号3)を与える。MNプロモーターの推定ヌクレオチド配列を図2A-Fのnts3001から3540に示す(配列番号24)。

10

## 【0142】

遺伝コードの縮重のため、すなわち、1種類のアミノ酸を1より多いコドンがコードするため(たとえば、コドンTTA、TTG、CTT、CTC、CTA、およびCTGはそれぞれアミノ酸ロイシン(leu)をコードする)、たとえば、一つのコドンが別のものに置換されている配列番号1と3でのようなヌクレオチド配列の変動は、実質的に等価な本発明に記載のタンパク質またはポリペプチドを生じることがわかっている。MNcDNAのヌクレオチド配列および相補核酸配列におけるすべてのそのような変異は本発明の範囲に含まれる。

## 【0143】

さらに、ここに記載され図1および2に示されるヌクレオチド配列は、単離されここに記載されるcDNA、ゲノム、およびプロモーターヌクレオチド配列の正確な構造だけを表すことが理解される。わずかに改変されたヌクレオチド配列が見つかるかまたは、たとえば同様のエピトープを有するもののような実質的に同様であるかまたは相同なMNタンパク質およびポリペプチドをコードするように、当該分野で既知の技術によって改変することができることが予想され、そのようなヌクレオチド配列およびタンパク質/ポリペプチドは本発明の目的について同等物であると考えられる。等価なコドンを持つDNAまたはRNAは、MNタンパク質/ポリペプチドと相同であるかまたは実質的に相同であるタンパク質/ポリペプチドをコードする合成核酸配列、および前記の典型的な配列(配列番号1、3、および24)とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列、または遺伝コードの縮重が無ければ前記cDNAヌクレオチド配列とストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする核酸配列がそうであるように、本発明の範囲に含まれる。ここで示した核酸配列の改変および変異は、典型的なMN配列およびその断片と実質的に同じ配列を結果として生じると考えられている。

20

30

## 【0144】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、ここでは当該分野でストリンジェントな条件とされている標準的なハイブリダイゼーション条件に準じると考えられる。たとえば、ストリンジェントな条件は、NaCl 0.02Mから0.15M、温度50 から70 によって与えられるような相対的な低塩濃度および/または高温条件を包含すると一般的に理解されている。塩濃度0.15Mから0.9Mで温度が20 から55 までの範囲といった、よりストリンジェントでない条件は、高温のようにハイブリッド二重らせんを不安定化する役割を果たす増加する量のホルムアルデヒドを添加することによってよりストリンジェントにすることができる。

40

典型的なストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, pages 1.91 and 9.47- 9.51 (Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, NY;1989) ; Maniatis et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, pages 387-389 (Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY; 1982); Tsuchiya et al., Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, 71 (6): 721-725 (June 1991) に記載されている。

MNゲノム配列(配列番号3)を含むプラスミド--A4aクローンならびにXE1およびXE3サブクローン--は、American Type Culture Collection (ATCC)に1995年6月6日にそれぞれATCC 寄託番号97199、97200、および97198として寄託された。

50

完全なMNゲノム領域のエキソン-イントロン構造

重複するクローンの完全な配列は10,898bpを含む(配列番号3)。図3はヒトMN遺伝子の構成を描き、11個すべてのエキソンならびに上流の2個およびイントロンの6個のAlu反復配列の位置を示す。すべてのエキソンは小さく、27から191bpの範囲であり、445bpである第一のエキソンは例外である。イントロンの大きさは89から1400bpまでの範囲である。CAドメインはエキソン2~8によってコードされる一方、エキソン1、10、および11はそれぞれMN/CA IXタンパク質のプロテオグリカン様ドメイン、膜貫通アンカー、および細胞質尾部に対応する。下記の表1は、AG-GTモチーフを含む共通スプライス配列に従うスプライスドナーおよびアクセプター配列を列記する(Mount, Nucleic Acids Res. 10: 459-472 (1982))。



## 【表 1】

**表1**  
ヒトMN遺伝子のエキソン-イントロン構造

エキソン	サイズ	ゲノム位置**	配列番号	5'スプライスドナー	配列番号
1	445	*3507-3951	25	AGAAG gtaagt	46
2	30	5126-5155	26	TGGAG gtgaga	47
3	171	5349-5519	27	CAGTC gtgagg	48
4	143	5651-5793	28	CCGAG gtgagc	49
5	93	5883-5975	29	TGGAG gtacca	50
6	67	7376-7442	30	GGAAG gtcagt	51
7	158	8777-8934	31	AGCAG gtgggc	52
8	145	9447-9591	32	GCCAG gtacag	53
9	27	9706-9732	33	TGCTG gtgagt	54
10	82	10350-10431	34	CACAG gtatta	55
11	191	10562-10752	35	ATAAT end	
イントロン	サイズ	ゲノム位置**	配列番号	3'スプライス アクセプター	配列番号
1	1174	3952-5125	36	atacag GGGAT	56
2	193	5156-5348	37	ccccag GCGAC	57
3	131	5520-5650	38	acgcag TGCAA	58
4	89	5794-5882	39	tttcag ATCCA	59
5	1400	5976-7375	40	ccccag GAGGG	60
6	1334	7443-8776	41	tcacag GCTCA	61
7	512	8935-9446	42	ccctag CTCCA	62
8	114	9592-9705	43	ctccag TCCAG	63
9	617	9733-10349	44	tcgcag GTGACA	64
10	130	10432-10561	45	acacag AAGGG	65

\*\*位置は5'隣接領域を含む全ゲノム配列中でのヌクレオチド番号を表す[図2A-F]

\*数字は下記でRNase保護分析によって特定された転写開始部位に対応する

## 【 0 1 4 5 】

## MN遺伝子転写開始および終止部位のマッピング

国際公開第95/34650号 (Zavada et al.) は、MN遺伝子転写開始および終止部位のマッピングの過程を記載している。RNase保護分析を用いてMN遺伝子の5'末端の精密なマッピングを行った。プローブは均一に標識した470ヌクレオチドのコピーRNA(nt-205から+265) (配列番号66) で、これをMN発現HeLaおよびCGL3細胞に由来する総RNAとハイブリダイズし、配列決定ゲル上で解析した。その解析は、MN遺伝子転写は複数の部位で開始することを示しており、最長のMN転写産物の5'末端は、以前にRACEによって特徴づけられたよりも30nt長かった。

## 【 0 1 4 6 】

MNタンパク質および/またはポリペプチド

「MNタンパク質および/またはポリペプチド」(MNタンパク質/ポリペプチド)の語句は、ここではMN遺伝子またはその断片によってコードされるタンパク質および/またはポリペプチドを意味すると定義される。本発明に記載の典型的で好ましいMNタンパク質は、図1に示す推定アミノ酸配列を有する。好ましいMNタンパク質/ポリペプチドは、図1に示すMNタンパク質と実質的な相同性を有するタンパク質および/またはポリペプチドである。たとえば、そのような実質的に相同なMNタンパク質/ポリペプチドは、本発明のMN-特異的抗体、好ましくはMabsM75、V/10、MN12、MN9、およびMN7またはその同等物と反応するものである。

10

「ポリペプチド」または「ペプチド」は、ペプチド結合によって共有結合で結合したアミノ酸の鎖であり、ここでは50個以下のアミノ酸から成るとされる。「タンパク質」はここでは、50個より多いアミノ酸から成るポリペプチドと定義される。ポリペプチドという語は、ペプチドおよびオリゴペプチドの語を包含する。

## 【 0 1 4 7 】

MNタンパク質はいくつかの興味深い特性を示す:細胞膜局在化、HeLa細胞における細胞密度依存性発現、HeLa x線維芽細胞体細胞ハイブリッドの腫瘍原性表現型との相関、および、組織の中でも、多数のヒト癌における発現。MNタンパク質は腫瘍組織切片中に直接見出すことができるが、対応する正常組織には一般的に見られない(正常胃粘膜および膀胱組織のような例外は上記)。MNはまた、形成異常および/または腫瘍を示す組織標本の、形態的に正常に見える範囲で時々発現している。総合すると、これらの特性は、細胞増殖、分化および/または形質転換の調節におけるMNの関与の可能性を示唆する。

20

## 【 0 1 4 8 】

新生物性細胞によってin vivoで産生されたタンパク質またはポリペプチドは、細胞培養中の腫瘍細胞、または形質転換細胞によって産生されたものとは配列が異なる可能性があることを理解することができる。したがって、アミノ酸置換、伸長、欠失、短縮、およびその組み合わせを制限無く含む、変化したアミノ酸配列を有するMNタンパク質および/またはポリペプチドは、本発明の範囲に含まれる。体液中に現存するタンパク質は、タンパク質分解過程といった分解過程の対象となることもまた理解される;したがって、相当に短縮されたMNタンパク質およびMNポリペプチドが、たとえば血清といった体液中に見出される。「MN抗原」の語句は、ここではMNタンパク質および/またはポリペプチドを包含するように用いられる。

30

## 【 0 1 4 9 】

さらに、MNタンパク質およびポリペプチドのアミノ酸配列は遺伝子技術によって改変することができることが理解される。一種類以上のアミノ酸を欠失または置換させることができる。そのようなアミノ酸変化はタンパク質またはポリペプチドの生物学的活性に測定可能な変化を何ら生じない可能性があり、結果として本発明の範囲内のタンパク質またはポリペプチド、およびMN突然変異タンパク質を生じる。

## 【 0 1 5 0 】

本発明のMNタンパク質およびポリペプチドは、本発明に記載のさまざまな方法、たとえば、組み換えによって、合成によって、または他の生物学的的方法によって、すなわち、より長いタンパク質およびポリペプチドを酵素的におよび/または化学的に切断することによって、作製することができる。MNタンパク質を作製するのに好ましい方法は組み換え手法による。

40

## 【 0 1 5 1 】

MNタンパク質およびポリペプチドの組み換え産生

図1に示すMNタンパク質またはその断片を作製するための代表的な方法は、MNcDNAの完全長または適当な断片を適当な発現ベクターに挿入することである。前出の国際公開第93/18152号(Zavada et al.)では、融合タンパク質GEX-3X-MN(現在の名称はGST-MN)の、ベクターpGEX-3X(Pharmacia)中の部分cDNAを用いた産生が記載されている。XL1-Blue細胞が

50

らの非グリコシル化GST-MN(MN融合タンパク質であるMNグルタチオンS-トランスフェラーゼ)。

#### 【0152】

国際公開第95/34650号 (Zavada et al.) は、発現プラスミドpEt-22b (Novagen Inc. ; ウィスコンシン州マディソン(米国)) を用いた、昆虫細胞から発現されたグリコシル化MNタンパク質および E. coli から発現された非グリコシル化MNタンパク質の両方の組み換え産生を記載している。組み換えバキュロウイルス発現ベクターを用いて昆虫細胞に感染させた。グリコシル化MN20-19タンパク質は、組み換えによって、バキュロウイルス感染sf9細胞 (Clontech ; カリフォルニア州パロアルト(米国)) で産生された。

#### MN-特異的抗体の作製

「抗体」の語は、ここでは抗体全体だけでなく抗体の生物学的に活性である断片、好ましくは抗原結合領域を含む断片も含むと定義される。モノクローナルおよびポリクローナル抗体は、文脈が示す通りその語によって包含されて用いられる。抗体の定義にさらに含まれるのは、MNタンパク質ともう一つの別の組織-特異的抗原とに特異的な、二重特異性抗体である。Von Mehren et al., Annu. Rev. Med., 54: 343-369 (2003) は、癌治療のためのmabsの用途を説明し、その好ましい断片を明確に描写する。

#### 【0153】

腫瘍治療に用いられる抗体断片の設計には、大きさが決定的に重要である; より小さな断片はしばしば親和性および抗原特異性が低下している。ペプチド結合 $V_H$ および $V_L$ ドメインから成る約25kDaの一本鎖FV(scFv)分子の一群の分子は、有効な標的手段であるためには十分に大きく、一方、抗体を基盤とするより大きな試薬の構築のための基礎を提供する。

#### 【0154】

しかし、scFv分子は迅速な腎排泄を可能にするのに十分小さく、したがって放射性標識の魅力的な候補である。それらはまた、より遅い全身クリアランスと標的細胞に対するより大きい結合活性のために、二量体化してより大きい分子とすることができ、それらに腫瘍治療で有用である可能性を与えている。

国際公開第93/18152号および第95/34650号 (Zavada et al.) は、MN-特異的抗体を作製する方法を詳しく説明し、および、M75、MN7、MN9、およびMN12モノクローナル抗体のような代表的MN-特異的抗体を調製する工程を詳述している。二重特異性抗体。二重特異性抗体は二種類の目的の特異性の抗体を化学的に結合させることによって作製することができる。二重特異性MAbsは、好ましくは2種類のハイブリドーマの体細胞ハイブリダイゼーションによって生じることができる。MNタンパク質ともう一つの抗原を標的とする二重特異性MAbsは、MN-特異的MAbsを産生するハイブリドーマを他の抗原に特異的なMAbsを産生するハイブリドーマと融合することによって産生することができる。たとえば、MN-特異的MAbを産生するハイブリドーマと抗細胞障害性抗体を産生するハイブリドーマとの融合によって形成された細胞(クアドローマ)は、親抗体の特異性を有するハイブリッド抗体を産生する。(たとえば、Immunol. Rev. (1979); Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol., 41: 793 (1977); van Dijk et al., Int. J. Cancer, 43: 344-349(1989) を参照)。このように、MN-特異的MAbを産生するハイブリドーマを、たとえば抗T3抗体を産生するハイブリドーマと融合し、細胞障害性T細胞をMN発現腫瘍細胞にターゲティングすることができるMN/T3二重特異性抗体を産生する細胞株を得ることができる。

#### 【0155】

治療的および/または画像処理用途には、抗体が生物学的に活性である抗体断片、好ましくは遺伝子操作された断片、より好ましくは $V_H$ および/または $V_L$ 領域から遺伝子操作された断片であることが好ましく、さらにより好ましくはその超可変領域を含む。しかし、一部の治療的用途には、MNタンパク質および細胞障害性細胞をターゲティングする二重特異性抗体が好ましい。

#### 【0156】

さまざまなCA IXドメインに対するヒト化または完全ヒト抗体

10

20

30

40

50

臨床用途には、診断的／予後診断的または治療的であっても、しかし好ましくは治療的用途には、ヒト化またはより好ましくは完全ヒトCA IX特異的抗体を用いるのが好ましい。そのような抗体は、CA IXドメイン、PGおよびCA領域を含む細胞外ドメイン、TMおよび／またはICドメインのうち任意のものに対して作製することができる。CA IXを異常に発現する細胞を、細胞外ドメインに対する、より具体的にはPGおよび／またはCA領域のいずれかに対するCA IX-特異的抗体と接触させることによって、ダウンレギュレートするのが好ましい。CA IXのシグナル伝達に、ICドメインをそれに特異的な抗体と接触させることによって干渉することもできる。

#### 【0157】

ヒト化および完全ヒト抗体を、遺伝子導入マウスの使用を含む抗体工学によって当業者が作製する方法を説明する参考文献の代表的なものは、下記を含む：Clark M., Immunol. Today, 21 (8): 397-402 (Aug. 2000); Davis et al., Cancer Metastasis Rev., 18 (4): 421-425 (1999); Gavilondo and Larrick, Biotechniques, 29(1): 128-132 and 134-136, 138 passim (July 2000); Zou and Rajewsky, Science, 262 (5137): 1271-1274 (Nov. 19, 1993); Sandhu, J. S., Crit. Rev. Biotechnol., 12 (5-6): 437-462 (1992); Vaughan et al., Nat. Biotechnol., 16 (6): 535-539 (June 1998); Hoogenboom and Chames, Immunol. Today, 21 (8): 371-378 (Aug. 2000); Holliger and Bohlen, Cancer Metastasis Rev., 18 (4): 411-419 (1999); Owens and Young, J. Immunol. Methods, 168 (2): 149-165 (Feb. 10, 1994); および Gura, T., Nature, 417 (6889): 584-586 (June 6, 2002)。

#### エピトープ

エピトープを含むペプチドに対するMAbの親和性は、たとえば、ペプチドが短い配列(4-6aa)であるかどうか、またはそのような短いペプチドの片側または両側により長いaa配列が隣接しているかどうか、またはエピトープについての試験においてペプチドが溶液中に存在するかまたは表面上に固定化されているか、といった状況によって変わる。したがって、MN-特異的MAbsに対するここに記載の代表的エピトープはMAbsの用途の状況によって変化することが当業者には予測される。

#### 【0158】

「MNタンパク質／ポリペプチドのエピトープに対応する」の語句は、一部の場所で、天然に存在するタンパク質またはポリペプチドのアミノ酸配列変異が抗原性であって新生物性疾患に対する保護免疫および／または抗腫瘍原性効果を与える可能性がある実際的な可能性を含むものと解される。可能な配列変異は、制限無く、アミノ酸置換、伸長、欠失、短縮、挿入、およびその組み合わせを含む。そのような変異は、それらを含むタンパク質またはポリペプチドが免疫原性であり、そのようなポリペプチドまたはタンパク質によって導かれた抗体が、ワクチンとして投与された場合に保護免疫および／または抗腫瘍原性活性を与えるのに十分な程度に、天然に存在するMNタンパク質およびポリペプチドと交差反応するならば、本発明の意図する範囲内にある。

#### MN-特異的細胞内発現抗体--細胞表面へのMNタンパク質の輸送を遮断するためのMN-特異的抗体の細胞内発現を介した標的化腫瘍死滅

抗体をコードする遺伝子は、抗原結合ドメインが細胞内で発現できるように操作することができる。小胞体管腔を標的としたそのような「細胞内発現抗体」は、細胞表面への細胞膜タンパク質の輸送を阻害する単純で効果的な機構を提供する。(Marasco, W. A., "Review--Intrabodies: turning the humoral immune system outside in or Intracellular immunization," Gene Therapy, 4: 11-15 (1997); Chen et al., "Intracellular Antibodies as a new class of therapeutic molecules for gene therapy," Hum. Gene Ther., 5 (5): 595-601 (1994); Mhashilkar et al., EMBO J., 14: 1542-1551 (1995); Mhashilkar et al., J. Virol., 71: 6486-6494 (1997); Marasco (Ed.), Intrabodies: Basic Research and Clinical Gene Therapy Applications, (Springer Life Sciences 1998; ISBN 3-540-64151-3) (世界の研究所からの、細胞内発現抗体を用いた前臨床試験を要約); Zanetti and Capra (Eds.), "Intrabodies: From Antibody Genes to Intracellular

ular Communication, "The Antibodies: Volume 4, (Harwood Academic Publishers ; ISBN 90-5702-559-0 (Dec. 1997)) ; Jones and Marasco, Advanced Drug Delivery Reviews, 31 (1-2): 153-170 (1998); Pumphrey and Marasco, Biodrugs. 9 (3): 179-185 (1998); Dachs et al., Oncology Res., 9 (6-7): 313-325 (1997); Rondon and Marasco, Ann. Rev. Microbiol., 51: 257-283 (1997) ; Marasco, W. A., Immunotechnology, 1(1) : 1-19 (1995); and Richardson and Marasco, Trends in Biotechnology, 13 (8): 306-310 (1995) )。

#### 【 0 1 5 9 】

MN-特異的細胞内発現抗体は、MNタンパク質の成熟および細胞表面への輸送を阻害し、それによってMNタンパク質が発癌過程で機能するのを防ぐ可能性がある。MNのEC、TM、またはICドメインに対する抗体は、この点で有用である可能性がある。MNタンパク質は、ECドメインからIC尾部にシグナルを伝達することによって、およびその後に細胞の内部にある他の細胞内タンパク質と結合することによって、シグナル伝達を媒介すると考えられている。MN-特異的細胞内発現抗体はこの結合を破壊しそのMN機能を混乱させることができる。

10

#### 【 0 1 6 0 】

MNタンパク質の機能を不活性化することは、形質転換されていない表現型への腫瘍細胞の復帰を結果として生じる。(Marasco et al. (1997)、前出)。子宮頸癌細胞におけるMNCdNAのアンチセンス発現は、ここで実証されるように、MNタンパク質の欠損が遺伝子導入された細胞の増殖抑制に結びつくことを示している。細胞表面へのMNタンパク質輸送の阻害が同様な結果を有することが同様に予想される。その予測を確認するためには、M75M Abの可変領域のクローニングおよび細胞内発現を試験すべきである。

20

好ましくは、細胞内で産生されたMN-特異的抗体は、一本鎖抗体、具体的には一本鎖可変領域断片またはsFvであって、重鎖および軽鎖可変ドメインが単一のポリペプチドとして合成され、可塑性のリンカーペプチド、好ましくは(Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>(配列番号116)によって分けられる。

MN-特異的な細胞内で産生された抗体は、新生物発生前/新生物性疾患を治療するために、MNタンパク質を異常に発現している新生物発生前/新生物性細胞に、MN-特異的抗体可変領域断片をコードする核酸を含む、発現調節配列に調節可能に結合したベクターを遺伝子導入することによって治療的に用いることができる。好ましくは、前記発現調節配列はMN遺伝子プロモーターを含む。

30

MN発現腫瘍細胞を標的とするためにMN-特異的抗体またはペプチドを用いる抗体媒介性遺伝子導入

DNAを密集化しその負電荷を中和することができるポリカチオンであるポリリジンと共有結合したMN-特異的抗体またはペプチドは、生物学的に活性であるDNAをMN発現腫瘍細胞に効率的に送達することが予想される。密集化したDNAが、MNプロモーターの調節下にあるHSVtk遺伝子を含む場合、その系はMN発現腫瘍細胞だけの認識および発現について二重に特異性を有する。密集したDNAはまた、CTL活性を誘導するサイトカイン、または他の生物学的に活性である分子をコードすることもできる。

40

#### 【実施例】

#### 【 0 1 6 1 】

下記の実施例は説明のみを目的とし、本発明を制限することは決して意図されない。

#### 【 0 1 6 2 】

#### 実施例 1

#### CA IX-欠損マウスの作製

#### 材料および方法

#### マウスCar9cDNAのクローニング

マウスcDNAは、RT-PCRによって、ヒトCar9cDNA(EMBL登録番号X66839;配列番号70)に由来するプライマーを用いて得た。テンプレート総RNAは、C57BL/6Jマウス胃から、酸グアニジウムチオシアネート-フェノール/クロロホルム単離によって調製した(Siebert et a

50

l. (1993) )。第一鎖合成は、標準的条件下でSuperScriptII逆転写酵素(Life Technologies, ドイツ)を用いて実施した。ヒトプライマーの組は下記の通りであった:センス ATC CAC GTG GTT CAC CTC AG (配列番号71)およびアンチセンス CTT TGG TTC CCC TTC TGT GC (配列番号72);図1A-1CのヒトcDNA断片760-1345 (配列番号73)に対応。PCR反応は30サイクルで実施した(94℃、30秒、55℃、40秒、および72℃、60秒)。オープンリーディングフレーム、3'-および5'-非翻訳領域を含む全体のcDNAは、3'および5'RACE(cDNA末端迅速増幅)によって得た。3'および5'RACEキット(Life Technologies)は取扱説明書通りに使用した。2種類の遺伝子-特異的プライマーを3'RACEに使用した:センスS1-CAG GAG AGC C CA GAAGAA AA (配列番号74);センスS2-TGA AGG GTC TCT GAC CAC AC (配列番号75)。3種類の遺伝子特異的プライマーを5'RACEに使用した:アンチセンス A1-AGC TGT AGG AGGAA G GCG AT (配列番号76);アンチセンス A2-TGA CAGCAA AGAGAA GGC CA (配列番号77);アンチセンス A3-CAG GGA AGGAAG CCT CAA TC (配列番号78)。結果として得られたすべての増幅産物は、TAクローニング(登録商標)キット(Invitrogen、オランダ)を用いてクローニングし、アプライド・バイオシステムズ自動シーケンサーを用いて配列決定した。cDNA配列はEMBLに寄託された(受託番号AJ245857;配列番号79)。

#### マウスCar9遺伝子のクローニング

マウス胚性幹(ES)細胞129/SvBACライブラリー(Genome Systems, 米国)を、完全長Car9cDNAを用いてスクリーニングした。BAC DNAはさまざまな制限エンドヌクレアーゼを用いて分析し、マウスCar9cDNAとハイブリダイズした。

EcoRI(6.5kb)およびKpnI(1.4kb)消化の結果得られた、選択された陽性クローンを、pBluescript KSにサブクローニングし、自動配列決定によって解析した。ゲノム配列はGenBankに寄託した(受託番号AY049077;配列番号80)。

#### Car9欠損マウスの作製

サブクローニングされたゲノムEcoRI断片に由来しCar9遺伝子の最初の6個のエキソンを含むEcoRI-HindIII断片(5.9kb)を、pCar9-neoターゲティングベクターの構築に使用した。pCar9-neoベクターは、標準的な組み換え技術によって、BamHI制限部位を欠いたpBluescriptKSで構築した。EcoRI-BamHI制限断片(1.5kb)を、プロモーターと第一のエキシソンの一部とを含む5'ゲノム腕として使用した。BamHI-HindIII制限断片(4.5kb)を、第一のエキシソンの終わりからエキソン6まで伸びる3'ゲノム腕として使用した。この手法を用いて、2つのBamHI部位の間に位置する14bp領域の配列を第一のエキソンから除去し、ホスホグリセリン酸キナーゼ-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(pgk-neo)カセットで置換した。

直線化ターゲティングベクターをE14ES129/Ola細胞株にエレクトロポレーションによって導入した。標的となったES細胞クローンを、G418(400pg/ml)を用いた選択によって濃縮し、EcoRI-XbaI断片を外側5'プロンプに、およびHindIII-EcoRI断片を外側3'プロンプとして用いたサザンブロット分析によって検出した(図8を参照)。

クローニングしたES細胞株をC57BL/6J胚盤胞に注入し、C57BL/6J-129/Olaキメラマウスを作製した。キメラは相同組み換えによって挿入されたpCar9-neoを有する2種類の異なるESクローンから作製した。成熟したキメラ子における129/Olaの寄与は被毛色によって判定した。上記のプロンプを用いたサザンブロッティングを使用して、標的対立遺伝子を有するマウスを識別した。動物実験は政府機関LAGETSI(ベルリン)によって許可番号G0224/00として承認された。

#### 【0163】

#### 標的遺伝子から発現したCar9 mRNAの分析

Car9<sup>+/+</sup>およびCar9<sup>-/-</sup>マウス胃からのRNAの単離、RT-PCRおよび5'RACEを、上述の通り、下記のプライマーを用いて実施し分析した:(i) 5'RACE用プライマー:900A アンチセンス-GAT CA TCC AAA CCT GGG ATC TCA A (配列番号81); 800A アンチセンス-TCC TGC AG A AAG GCA GCC AAA ACT G (配列番号82); 700A アンチセンス-CAG GGAAAC GGT GAC CAT T GA CTG T (配列番号83);(ii) RT-PCR用プライマー: A (MNG センス)-GAC ACC CCA GTC A GC TGC ATG GCC T (配列番号84);B (NeoV)-CAT TCT CAG TAT TGT TTT GCCAAG TT (配列番

号85); C (Neo センス)-CGA AGG AGC AAA GCT GCT ATT GGC C (配列番号86); D (MNA アンチセンス)-TGT GCT CAG GAG CCT CGG GAG TCG A (配列番号87); E(EXS1センス)-AGT CA A GGT TCC CAC GGG GATGAA (配列番号88); F(1403Aアンチセンス)-AAG GAG GCT GTATAA C AG GCA GGA C (配列番号89)。

#### ウサギ 抗マウス CA IX ポリクローナル抗体の作製

完全長Car9cDNAを、細菌発現ベクターpGEX-4T-1にサブクローニングした。GST-mCA IX 細菌組み換えタンパク質は、形質転換されたE.coli DH5 ( ) 細胞株で、1mMIPTGを用いた5時間の誘導後に産生され、細菌細胞溶解物からグルタチオンセファロース4B (Amersham Pharmacia, スウェーデン)を用いたアフィニティクロマトグラフィーによって単離された。ウサギに1mgのGST-mCA IX融合タンパク質およびフロイント完全アジュバントを筋肉内接種した。月間隔での次の3回の注射はタンパク質0.25mgおよび不完全アジュバントを用いて投与した。GST-特異的抗体を除去するため、免疫血清はグルタチオンセファロース結合GSTタンパク質を用いて精製し、マウスCA IXに対する反応性を試験した。選択された血清は、1:500希釈で、下記の免疫組織化学分析、およびイムノブロットティングに使用した。要約すると、Car9<sup>+/+</sup>およびCar9<sup>-/-</sup>マウスの胃粘膜および、リポフェクトアミン (Life Technologies)を用いて、遺伝子導入試薬だけを与えた、およびCar9cDNA-遺伝子導入されたNIH3T3細胞から、タンパク質抽出物を調製した。総タンパク質濃度はBCAキット(Pierce, 米国)を用いてすべての試料で測定し、等量の総タンパク質を含む部分標本を、他所で記載された通り分析した (Pastorekova et al. (1997))。

#### 血液ガス、電解質、および血清ガストリンの分析

末梢血循環を増大させるため、覚醒マウスを赤色光灯下で10分間静かに加温した。数個体から、尾部静脈より血液(1.5~5.5ml)をヘパリン処理試験管、EDTA処理試験管、または無処理試験管に採取し、ガス、電解質、およびpHについて自動臨床検査装置(Boehringer Mannheim, ドイツ)を用いて取扱説明書に従って分析した。ガストリン濃度は、記載の通り (Hocker et al. (1996)) ヒトガストリン17に対して作製した特異的抗体を用いて測定した。

【 0 1 6 4 】

#### 組織化学および免疫組織化学分析

Car9<sup>+/+</sup>およびCar9<sup>-/-</sup>マウス由来の組織標本を胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸、肝臓、膵臓、腎臓、および肺から切り取った。標本はカルノア液(無水エタノール+クロロホルム+氷酢酸を6:3:1の比で)中で24時間、4 にて、または4%中性緩衝ホルムアルデヒド中で24~48時間、室温にて固定した。試料をその後脱水し、真空オーブン中で58 にてパラフィンワックス中に包埋し、5 μmの切片をゼラチン被覆顕微鏡スライドグラスに乗せた。組織化学分析用には、切片をヘマトキシリン/エオシンを用いて、およびジアスターゼ耐性過ヨウ素酸シッフ(PAS)を用いて染色した。免疫組織化学分析は下記の一次抗体を用いて実施した: 抗CA IXウサギポリクローナル血清(上述、1:500希釈)、抗PCNAウサギポリクローナル抗体、抗E-カドヘリンウサギポリクローナル抗体、抗 カテニンウサギポリクローナル抗体、および抗 カテニンウサギポリクローナル抗体(すべてSanta Cruz Biotechnology、(カリフォルニア州サンタクルス)より、終濃度5 μg/100 μ)、ポリクローナルヒツジ抗ヒトペプシノゲンII抗体(Binding Site、英国、1: 2000希釈)、およびポリクローナルウサギ抗ブタ胃H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase サブユニット(Calbiochem-Novabiochem、ドイツ、1:50希釈)。組織切片の免疫染色は、ピオチン-ストレプトアビジン複合法によって実施し、下記の工程を用いた:(1)非希釈ウシ初乳乳漿を用いた40分間の切片の前処理およびリン酸緩衝生理食塩水(PBS)での洗浄。(2)1%ウシ血清アルブミン(BSA)含有PBS中で第一抗体と1時間のインキュベーション(抗H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase抗体を用いた一夜のインキュベーションを除く)。(3)ウシ初乳乳漿を用いた40分間の処理およびPBSでの洗浄。(4)1%BSA-PBSで1:300希釈したピオチン化ブタ抗ウサギIgG(Dakopatts, Copenhagen, Denmark)またはロバ抗ヒツジ/ヤギIgG(Binding Site)と1時間のインキュベーション。(5)PBSで1:500希釈したペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン(Dakopatts)と30分間のインキュベーション。(6)15mL PBS + 5 μL 3

0% $\text{H}_2\text{O}_2$ 中に9mgの3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩(Fluka, Buchs, スイス)を含むDAB溶液中で2時間のインキュベーション。切片はインキュベーション工程2、4、5の後、3回、10分間、PBSで洗浄した。すべてのインキュベーションおよび洗浄は室温にて実施し、切片は最後にPermount(Fisher Scientific, ニュージャージー州フェアローン(Fair Lawn))に包埋した。染色した切片は、Nikon Eclipse E600(東京)顕微鏡を用いて検鏡し撮影した。

#### 形態計測的分析およびデータの統計的評価

26および35週齢の10個体の野生型および10個体のCA IX-欠損マウス由来の胃表本を、ペプシノゲンCおよび $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPaseサブユニットについて染色した。総細胞および免疫染色細胞の両方を、マウス1個体当たり50個の縦断した腺で計数した。Mann-Whitney順位検定を適用して、 $\text{Car9}^{-/-}$ マウスに対して $\text{Car9}^{+/+}$ マウス中の細胞数を比較した。胃単位内の細胞の総数と旁細胞の数との間の関係を、両方の動物の群について回帰分析によって分析し、直線関係の強さをピアソン相関係数Rによって評価した。回帰直線の傾きはT検定によって比較した。2つの検定のそれぞれについて、0.05未満および0.01未満のP値はそれぞれ有意および高度に有意と考えられた。

【0165】

#### 結果

##### Car9cDNAの同定

マウスCA IXをコードするcDNAおよび遺伝子のクローニングおよび特徴づけは、CA IX-欠損マウスの作製に向けた第一段階であった。マウスCar9cDNA断片を、RT-PCRによって、ヒトcDNA由来のプライマー(Pastorek et al. (1994))およびC57BL/6Jマウスの胃から単離したテンプレートRNAを用いて単離した。完全長cDNAは、5'/3'方向の両方でのcDNA末端迅速増幅によって得られた。それは32bpの5'非翻訳領域、1311bpのオープンリーディングフレーム、および622bpの3'非翻訳配列から構成される1965bpを包含する(EMBLデータベースに登録番号AJ245857として寄託;配列番号79)。

【0166】

Car9cDNAは437アミノ酸タンパク質のコード容量を有し(EMBLデータベースに登録番号CA C80975(Q8VDE4))として寄託;配列番号90)、理論分子量は47.3kDaである。そのマウスタンパク質はそのヒトホモログと69.5%の配列同一性を示し、同様の予想ドメイン配置を有する(Opavsky et al. (1996))。アミノ酸(aa)1-31(配列番号91)はシグナルペプチドに相当する。成熟タンパク質のN末端細胞外領域(aa32-389)(配列番号92)は、プロテオグリカン様領域(aa48-107)(配列番号93)、および炭酸脱水酵素ドメイン(aa112-369)(配列番号94)から構成される。C末端領域(aa390-437)(配列番号95)は、膜貫通アンカー(aa390-411)(配列番号96)および短い細胞質尾部(aa412-437)(配列番号97)から成る。マウスとヒトCA IXの間の配列の差の大部分はプロテオグリカン様(PG)領域内で見つかった一方、CAドメインは最高の保存を示した。しかし、酵素活性部位に関与する5個の重要なアミノ酸( $\text{His}^{94}$ 、 $\text{His}^{96}$ 、 $\text{Glu}^{106}$ 、 $\text{His}^{119}$ 、 $\text{Thr}^{199}$ )のうち(Christianson and Cox (1999))、全部がヒトCA IXで保存されているが、マウスアイソザイムでは1個が変化している( $\text{Thr}^{199}$  Ser)。この置換にもかかわらず、マウスCA IXはスルホンアミドアガロースに結合し、マウスCA IXが酵素活性を有することを示唆した。

【0167】

Car9cDNAが利用できることによって、マウス組織におけるCar9mRNAの発現パターンの分析が可能になった。リボヌクレアーゼ保護分析(RNP)を、CAドメインをコードする領域の3'部分を検出するように設計した170bpのリボプローブを用いて実施した。ヒト組織およびラット組織における分布に基づいて予測される通り、Car9mRNAの最高レベルはマウス胃で検出された。中等度のレベルのCar9mRNAが小腸および結腸で見出された一方、腎臓および脳は非常に弱い発現を示した。肝臓および脾臓は陰性であった。特筆すべきことに、RNPシグナルは胎生E18.5日齢のマウス胚にも存在したが、胚性幹細胞に、およびE10.5日胚には存在しなかった。このことは、マウス消化管の発生におけるCA IXの役割を示唆する。

##### Car9 遺伝子の構成



Car9 遺伝子を単離しその構成を決定するため、完全長 Car9cDNAを、pBAC108Lのマウス胚性幹細胞129/Ola ゲノムライブラリーのスクリーニングに使用した。マウス 野生型 ゲノム DNAの 制限 マッピングおよび サザン プロット 分析 によって確認された通り、完全なCar9 ゲノム 配列を含む一つのBACM-355(G13) クローン が得られた。このクローンに由来する3種類の重複するゲノム断片を、pBluescript II KSにサブクローニングした。

#### 【0168】

ゲノム配列(GenBank登録番号AY049077; 配列番号80)の分析は、Car9遺伝子がマウスゲノムの8.7kbにわたり、11個のエキソンおよび10個のイントロンから成ることを明らかにした。イントロンの分布およびエキソン対タンパク質ドメインの関係はヒトの対応物と同様である (Opavsky et al. (1996))。サザンハイブリダイゼーションパターンは、Car9が1コピー遺伝子であることを示した。5.9kbを包含しプロモーター領域およびエキソン1~6にわたるEcoRI-HindIII断片を、ターゲッティングベクターの構築に用いた。

#### 【0169】

##### Car9遺伝子のターゲッティングおよびCar9<sup>-/-</sup>マウスの作製

マウス胚性幹細胞においてCar9遺伝子を破壊するために、pCar9neoターゲッティングベクターを、上述のゲノム断片を用いて構築した。第一のエキシソンを、逆方向のpgk-neoカセットを用いた14bp領域(268-282位の)の置換によって中断した(図8A)。除去した領域はCA IXのPGドメインの一部に相当したため、pgk-neoカセットの挿入はこのドメインの破壊、およびシグナルペプチドをコードする配列の、タンパク質の残りの部分からの分離を引き起こした。さらに、14bpの欠失は、マウスCar9mRNAにおけるリーディングフレームの移動を生じその正確な翻訳を妨げるように設計された。

E14胚性幹細胞のエレクトロポレーションおよびG418による選択後、相同組み換えを受けた8種類のクローンが検出された。そのうち2種類を以降の操作のために選択した。3'および5'外部プローブを用いたサザンプロットングによって確認された通り、両方のターゲッティングされたクローンはCar9遺伝子座に意図しない再配列を有しないことが示された。突然変異ES細胞のこれらの2株を用いて、健康で繁殖力のあるキメラマウスおよびCar9<sup>+/-</sup>マウスが作製された。異型接合マウスどうしの交配の結果、尾部ゲノムDNA試料からのサザンプロット分析によって実証された通り、3種類すべての遺伝子型がメンデル分布で子孫に生じた。(サザンプロットは異型接合交配に由来する子孫の遺伝子型分析を示した。3週齢マウスの尾に由来するDNAを、EcoRIを用いて消化し、3'プローブとハイブリダイズした。バンドは野生型(6.5kb)および突然変異(8.3kb)対立遺伝子にそれぞれ対応した)。

#### 【0170】

遺伝子特異的プライマーを用いたRT-PCR分析は、同型接合Car9<sup>-/-</sup>マウスはエキソン1を欠いたmRNAを発現したことを明らかにした。対照的に、変異および野生型転写産物の両方がエキソン2~11を含んだ。さらに、pgk-neo由来プライマーは、エキソン1-特異的プライマーと組み合わせて、Car9<sup>-/-</sup>マウス由来のゲノムDNAのPCR増幅を可能にし、Car9遺伝子座へのそのカセットの導入が成功したことを確認した。突然変異RNA由来の対応するRT-PCR増幅産物は存在せず、Car9mRNAの5'末端が失われているという追加の証拠をもたらした。RACE分析によって得られた5'mRNA配列から、これは突然変異Car9転写産物の、5'非翻訳領域およびシグナルペプチドをコードする配列、PG様ドメインの大部分、およびpgk-neoカセットの大半の欠失に繋がる予期しないスプライシングが原因であると推測された。このように、Car9<sup>-/-</sup>マウスは、PGドメイン関連配列(nt283から開始)の3'部分を介してCar9cDNAの残りの部分と結合したpgk-neoカセットに由来する77ヌクレオチドを含むキメラmRNAを発現した。2個の可能な翻訳開始コドンが存在した。第一のAUGコドンはフレーム外であった。第二のものは、シグナルペプチドを欠くため適切にプロセッシングされ得ない短縮タンパク質の翻訳に繋がる可能性がある。この推定翻訳産物は突然変異体の胃に存在しないことが、完全長組み換えマウスCA IXタンパク質に対して作製したウサギポリクローナル抗血清を用いて実施したウェスタンブロットング分析によって実証された。(野生型

Car9および突然変異Car9<sup>-/-</sup>マウス胃上皮に由来するタンパク質抽出物のウェスタンブロット分析を実施した。完全長Car9cDNAを遺伝子導入されたNIH3T3細胞に由来する抽出物、および遺伝子導入試薬だけを与えたNIH3T3細胞に由来する抽出物が対照として用いられた。プロットは、完全長組み換えGST-mCA IXタンパク質に対して作製した抗CA IXウサギ抗血清を用いて処理した。

#### 【0171】

CA IX-欠損マウスは、成長、行動、生殖能、健康、および寿命について野生型同腹仔からの逸脱を示さなかった。その肺、脾臓、肝臓、腎臓空腸、回腸、および結腸に形態的および組織学的異常は観察されなかった。

#### CA IX突然変異マウスの胃表現型

Car9<sup>-/-</sup>マウス由来の胃標本の組織病理検査は、異型接合および野生型の同腹仔の胃と比較した場合、顕著な過形成変化を一様に示した。胚発生の間には突然変異マウスで変化は目に見えなかった一方、生後P0.5日で粘膜の厚みの増大が見られた。過形成は4週齢の動物で顕著になったが、年齢と共に進行はせず、1.5歳マウスでは同様のままであった。

#### 【0172】

成熟Car9<sup>-/-</sup>マウスでは、過形成変化は腺胃上皮だけに作用した一方、非腺性の前胃の扁平上皮は正常のままであった。最も著しい過形成は体領域に關した。粘膜襞は同型接合突然変異マウスにおいて野生型同腹仔よりも顕著であり、小窩と腺の比は、野生型および異型接合動物における通常の1:4から、1:3または1:2にさえ上昇した。Car9<sup>-/-</sup>マウス粘膜におけるこれらの過形成変化は、低い立方上皮細胞の単層で覆われた多数の病的な嚢胞を伴った。月間隔で最大1.5歳齢まで検査した2~3個体のマウスに由来する胃切片のどれにも、形成異常の形態的徴候は観察されず、すべての年齢時点で上皮固有層の正常構造が見られた。

Car9<sup>-/-</sup>マウス粘膜における過形成の存在は、胃切片の形態計測的分析によって確認され、それは10個体のCar9<sup>+/+</sup>マウスにおいて、10個体のCar9<sup>-/-</sup>マウスと比較して、50個の胃単位当たりで計数した細胞の総数に高度に有意な(P=0.0007)差を明らかにした(図9A参照)。中央値に基づいて、CA IX欠損マウスの粘膜は対照上皮より薬30%多い細胞を含んだ。

#### 【0173】

興味深いことに、軽度から中等度の形成異常を伴う小さい十二指腸腺腫が、Car9<sup>-/-</sup>マウスの15個体中3個体に観察された。それらの出現がまた、近位小腸で通常発現しているCA IXの喪失を伴ったことは無視できない。

#### 【0174】

#### 過形成粘膜における細胞増殖、死滅、および接着

Car9<sup>-/-</sup>マウスにおける胃過形成の根底にある可能性のある機構を調べるため、突然変異マウスおよび野生型マウスの両方から得られた胃切片の免疫組織化学分析を実施した。最初に、野生型の胃におけるマウスCA IXの分布を分析するためにマウスCA IXに対して作製した抗体を使用した。強いCA IX-特異的染色が成熟Car9<sup>+/+</sup>マウスの胃体に見られたが前胃には見られず、Car9<sup>-/-</sup>マウスの胃体だけに表現型変化の逆転した存在が見られるが前胃には見られないのと同じである。Car9<sup>+/+</sup>胃体の陽性染色はすべての上皮細胞に分布したが、その強度は成熟した腺および表層の窩細胞の基底外側表面で非常に強かった。

特筆すべきことに、免疫組織化学染色はE15.5およびE17.5胚の胃にCA IXが存在しないことを明らかにしたが、CA IXがマウス新生仔の胃で弱く発現していることを示した。

#### 【0175】

過形成は細胞増殖の増加および/またはアポトーシスの減少を伴う可能性があるため、これらの2つの過程のうち1つ、または両方が観察された胃表現型の原因であるかどうかの決定が重要と考えられた。増殖する細胞のマーカーであるPCNAの発現を試験し、観察された特徴的な染色パターンは、増殖区域をCar9<sup>+/+</sup>マウス粘膜に限定した。対照的に、大きく広がった染色シグナルによって示唆されるように、Car9<sup>-/-</sup>マウスでは増殖部分は相当地に拡大していた。突然変異上皮におけるPCNA陽性細胞の総数は顕著に増加していた。

方、アポトーシスの程度を評価するために実施したアネキシンV染色およびTUNEL DNA断片化分析は、アポトーシス細胞の数についてCar9<sup>-/-</sup>とCar9<sup>+/+</sup>マウス胃の間に差を示さず、したがって、過形成は細胞死の減少が原因であるとする事ができないことを示した。

【0176】

胃上皮過形成と、E-カドヘリン、 $\beta$ -カテニン、および  $\beta$ -カテニンを含む接着関連分子の発現との間の可能な関係を分析するために、さらに免疫組織化学染色を実施した。これらの分析は、上皮組織の適当な発達および組織化にとってのカドヘリン/カテニン媒介経路の重要性 (Gumbiner, B. (1996))、および細胞接着および情報伝達におけるCA IXの可能な役割を支持する観察 (Zavada et al. (2000)、Pastorekova et al. (1997)) に基づいた。我々は、野生型動物の胃粘膜はE-カドヘリンを主に、深い腺および表面小窩に位置する成熟上皮細胞の基底外側表面に、正常のCA IX分布を思わせる方法で発現したことを見出した。対照的に、Car9<sup>-/-</sup>マウス胃のE-カドヘリン陽性染色は粘膜全体でわずかにより弱く、その局地的配置は明白さがより低かった。しかし、突然変異胃におけるウェスタンブロッティングによって測定された総E-カドヘリンレベルは野生型対照と異ならなかった。 $\beta$ -および  $\beta$ -カテニンの発現は同様のパターンを示した:両方のカテニンは、大部分がCar9<sup>+/+</sup>マウスの成熟上皮細胞に存在し、一方Car9<sup>-/-</sup>マウスにおけるそれらの染色シグナルはより弱く、まとまりがなかった。そのデータは、CA IXの喪失は、試験した接着分子の発現レベルに及ぼす著しい影響が無いにもかかわらず、正常な細胞-細胞接着の混乱を結果として生じることを示す。

【0177】

#### Car9<sup>-/-</sup>マウス胃の体部における異常な細胞系譜分布

上記の観察は、Car9<sup>-/-</sup>マウスの胃上皮における主な細胞型の空間的分布および割合を、Car9<sup>+/+</sup>対照と比較して調べるように我々を導いた。粘液産生小窩細胞を検出するために、腺胃の切片を、ジアスターゼ耐性過ヨウ素酸シッフ(PAS)を用いて染色した。野生型胃体のPAS染色は表面小窩領域で強陽性であった。対照的に、Car9<sup>-/-</sup>マウスは顕著に異なる染色パターンを示し、PAS陽性範囲の広がりにはいくらか個体間変動が存在したが、強いPASシグナルは主に表面から体粘膜の基底部まで広がっていた。これはおそらく粘液細胞の多量の産生および異常な移動の結果として生じる可能性があり、粘液細胞はそのため胃上皮の不適當な部分を占める。

旁細胞系譜マーカーとして作用するH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseサブユニットの免疫組織化学検出後に、形態計測的分析によって多数の旁細胞を評価した。図9Bで示される通り、Car9<sup>-/-</sup>マウスの胃は野生型対照と比較した場合、有意に低下した割合の旁細胞を含む(P=0.0051)。回帰分析は、野生型およびCA IX-欠損マウス胃の両方に由来する胃単位中の旁細胞の数と細胞の総数との間に有意な正の相関を明らかにした(それぞれピアソン相関係数R<sup>2</sup>=0.68およびR<sup>2</sup>=0.61)。Car9<sup>-/-</sup>およびCar9<sup>+/+</sup>マウスにそれぞれ由来する胃単位の回帰直線の傾きには有意差があり(P<0.0005)、またCA IX-欠損胃単位は、過形成の増加に伴い、旁細胞の産生の減少に向かう明らかな傾向を示した(図9D)。

全体として、これらのデータは、CA IXの喪失は旁細胞の分化の混乱を結果として生じるという見解を支持する。

【0178】

機能する主細胞の位置および数を測定するため、我々は主細胞系譜特異的マーカーであるペプシノゲンCについて免疫組織化学染色を実施した (Karam et al. (1997))。ペプシノゲン顆粒を含む細胞は、正常およびCA IX-欠損マウス胃上皮の両方で基底部に限定された。しかし、形態計測的分析は、Car9<sup>-/-</sup>マウスの胃体粘膜において主細胞の顕著な減少を明らかにした。図9Cに示すように、主細胞のパーセンテージにおける減少は高度に有意であった(P=0.0001)。

【0179】

Car9<sup>-/-</sup>マウス胃上皮の異常な組成は、CA IXの喪失が、旁細胞および主細胞を犠牲にして分化プログラムを小窩細胞の形成に向け直すことによって、細胞系譜割り当てに影響を及ぼしていることを示唆する。

### 全身性酸-塩基および電解質状態

正常胃粘膜における多量の発現、および消化管内で作用する他の炭酸脱水酵素との関係に基づいて、CA IXは酸塩基平衡の維持に関与することが提案されている。CA IXの基底外側の局在化は、CA IXが、高度に活性であるCAIIアイソザイムの触媒特性と直接結びつく胃酸の産生よりも、粘膜内および/または粘膜下領域との電解質交換に関与し得ることを示した (Parkkila et al. (1996))。したがって、*Car9*<sup>-/-</sup>マウスの全身性の酸/塩基および電解質状態を調べた。成熟した突然変異マウスから採取した血液試料を、年齢を合わせた野生型対照に由来する試料と、血液pHおよび血漿電解質の含量に関して比較した。我々はまたガストリンの血清中濃度も、それが胃酸分泌における変化を予測する可能性があるため、測定した。しかし、検討したどのパラメータについても統計的有意差は見られず(表2)、胃の過形成を結果として生じるCA IXの消失は大きな生理的欠陥に結びつかなかったことを示唆した。

【表2】

表2

血漿電解質、血液pH、および血清ガストリンを *Car9*<sup>+/+</sup>および *Car9*<sup>-/-</sup>動物の血液から2回の別々の試験で測定した。

遺伝子型	pH	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	血清 ガストリン
		(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(pg/ml)
<i>Car9</i> <sup>+/+</sup>	7.30±0.035	24.35±1.95	119±2	3.8±0.6	139.5±4.5	60±4
<i>Car9</i> <sup>-/-</sup>	7.32±0.015	24.15±0.55	118±6	4.9±0.4	141.5±3.5	59±12

【0180】

### 考察

マウスにおける胃粘膜の形態形成は、妊娠後期に一連の現象によって開始する複雑な過程である。これらは、胎生E18日付近の原始芽の形成、生後P1日目からP7日目までの前駆細胞分化、前駆細胞とその子孫の数の増加によるP7からP15までの芽の伸長、そして最後にP15とP21の間の胃単位の集合および細胞移動-分化プログラムの区分化を含む (Karam et al. (1997))。この複雑な過程の達成の結果、単位の間部分にある幹細胞および前駆細胞に細胞増殖が限定されている、自己再生する上皮を生じる。それらの前駆細胞は二方向性に移動し、同時に分化して、機能する成熟細胞によって単位の表面および基部を供給する (Wright, N. A. (2000))。細胞分化と増殖との間の動的平衡の維持は、適当な粘膜機能および全体性を確実にする。

【0181】

CA IXの発現は、胃単位形態形成の早い段階の間であるP0.5日のマウス新生仔胃において低いレベルで最初に検出可能であり、その量は成熟年齢に向かって増殖する。そのタンパク質は胃体の成熟粘膜全体で上皮細胞の膜を占めるが、そのレベルは成熟表層小窩細胞および深部腺細胞でより高い。

【0182】

発現パターンと合致して、また胃単位形態形成の過程と偶然に一致して、CA IXをコードする*Car9*遺伝子のターゲッティング破壊は胃過形成の発現に結びつく。胃粘膜の厚みにおける最初の軽度の変化は、新生仔*Car9*<sup>-/-</sup>マウスでP0.5日に早くも出現する。これは野生型胃でCA IXの発現が始まる時である。CA IXの不在の結果、おそらく過剰な細胞増殖の結果として芽の部分的な伸長が生じる一方、正常の芽伸長は後でP7日とP15日の間に生じる。4週齢の突然変異マウス粘膜では、単位形態形成が完了している場合、過形成変化は明らかに目に見えるが、年齢に伴って進行はしない。調節解除された増殖は、細胞の目に見える形態的变化なしに、また細胞死における何らかの有意な変化無しに、粘膜に影響を与える。

興味深いことに、CA IXを通常発現する他の組織では、十二指腸腺腫の稀な例を除いて、追加の表現型変化は観察されていない。これは関連する炭酸脱水酵素アイソザイムによって提供される縮重による可能性があり (Parkkila et al. (1996))、同様にTcf-7/2遺伝子の破壊の結果として小腸だけで変化が生じるが、この遺伝子が高度に発現している結腸では変化が生じず、その破壊について同じように示唆されている (Korinek et al. (1998))。

Car9<sup>-/-</sup>胃体粘膜の過形成は、腺に対する小窩の比の上昇および粘液産生小窩細胞の異常な分布、および旁細胞および主細胞の有意な減少を伴う。これらの変化は、CA IXの喪失が系譜レパトリーに直接影響を及ぼし、また小窩細胞前駆細胞およびその子孫の上向きの移動を正常には導く位置的指示を部分的に乱す可能性があることを示す。あるいは、CA IXの消失は、他の細胞系譜に影響を及ぼす指示の重要な起源である旁細胞の分化に影響するであろう (Karam et al. (1997))。したがって、小窩細胞および主細胞の産生における不均衡は、旁細胞集団に置ける変化に二次的である可能性がある。

Car9遺伝子のターゲッティング破壊を有するマウスの表現型は、H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのαサブユニットを欠くマウス (Spicer et al. (2000)、Scarff et al. (1999))、Kv1q1電位依存性カリウムチャンネルを欠くマウス (Lee et al. (2000))、およびTGFβを過剰発現したマウス (Sharp et al. (1995)) を含む他の遺伝子操作されたモデルを思い出させる。これらのモデルはいくらかの類似性を示すが、Car9<sup>-/-</sup>モデルとは特定の面で異なる。H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのどちらかのサブユニットを欠くマウスは高ガストリン血症および胃酸欠乏性であり、胃酸の産生におけるH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseの確立された役割と合致する。両方のモデルは正常な数の旁細胞を含むが、それらは異常な分泌膜を有する。主細胞の数は、αサブユニットが欠損したマウスでは減少しているが、βサブユニットが欠損したマウスでは減少していない。Kv1q1-欠損マウスは副細胞過形成および、空胞を有する機能しない旁細胞の産生を示し、高ガストリン血症および胃酸減少症に結びつく。

#### 【0183】

対照的に、TGFβを過剰発現しているマウスでは、粘液小窩細胞集団の拡大および成熟した旁細胞および主細胞の減少にもかかわらず、血清ガストリン濃度には有意な変化が無い。これらの知見は我々の観察と合致する。血清ガストリン濃度の変化は通常は胃酸分泌の乱れを反映するため、両方の研究は、CA IXおよびTGFβは胃酸の産生に直接的に関与していない可能性があるが胃粘膜内で他の重要な機能を有することを示す。

入手可能なすべての事実に基づいて、CA IXは胃粘膜において細胞増殖の負の調節を介して、また移動関連分化プログラムの予想される調節成分として、分化と増殖の間の平衡に寄与するように見える。CA IXの喪失は、したがって、分化および移動シグナルからの増殖調節の分離、および結果的に、正常粘膜の全体性および構造の破壊に結びつく。

提案されたCA IX機能の基礎となる分子経路は不明である。細胞表面分子として、CA IXは増殖を妨げる成熟シグナルの受容および/または処理に関与している可能性がある。加えて、CA IXは分化、空間的配置、および細胞系譜の割り当てを導く指示の受容体として作用するであろう。他の遺伝子導入モデルとの表現型上の類似を考慮して、CA IX関連推定シグナル伝達経路において作用する可能な候補のリストは、間葉性転写因子Fkh6 (Kaestner et al. (1997))、腺胃の上皮で発現されるShhタンパク質 (Ramalho-Samos et al. (2000))、pS2トレフォイルタンパク質 (Lefebvre et al. (1996))、NF-κB2転写因子 (Ishikawa et al. (1997))、および/またはカドヘリン機能の調節因子IQGAP1 (Li et al. (2000)) を含むであろう。しかし、これらの遺伝子の遺伝子操作はCA IXについて観察されたものを超える表現型変化に繋がり、たとえば過形成の発生、または電解質状態の全身的变化といった、より明瞭な分化プログラムにおける変化および/または生理的欠陥に関与する。したがって、それらはCA IXの上流で作用するかまたは独立したシグナル伝達の性質を有する可能性がある。

#### 【0184】

実際、CA IXはシグナル伝達において機能するような素因を与えるいくつかの性質を有する。ヒトCA IXホモログのN末端に位置するPG様領域は、in vitroで細胞接着能力を有す

ることが示された (Zavada et al. (2000))。この領域を介して、基底外側膜に位置するCA IXは、粘膜細胞間および/または粘膜細胞と間質細胞の間の接着シグナルの伝達に影響を与える。この見解を支持して、CA IXを欠くマウスの胃粘膜は、決定的に重要である接着関連分子E-カドヘリン、 $\alpha$ -カテニン、 $\beta$ -カテニンの分布の乱れを示すが、それらの濃度は顕著に変濁してはいない。さらに、他の炭酸脱水酵素とのホモロジーから仮定して、CA IXの大きな酵素核は、受容体部位として作用する可能性がある広く深いポケットを形成する。RPTP および  $\beta$  に存在するCAドメインの、接着および分化の神経細胞特異的調節因子であるコンタクチンを結合する能力を考えると、この考えは非常にもらしい (Peles et al. (1995))。

#### 【0185】

胃粘膜におけるマウスCA IXの炭酸脱水酵素活性の機能的な関与は不明であり、それはまず二酸化炭素と炭酸の間の可逆的変換の触媒におけるCA IXの効率に関する正確な知識の欠如が原因であり、次にCar9<sup>-/-</sup>マウスにおいて全身性の酸-塩基およびガストリン不均衡が何ら存在しないためである。後者はまた、その活性がCA IXの欠損を補償し得る他のCAアイソザイムの存在にも関係する可能性がある。高度に活性である細胞質ゾルCAIIは、表面上皮細胞に存在してそこで重炭酸イオンを産生し、また旁細胞に存在してそこでは胃酸分泌のためのプロトンを供給する (Parkkila et al. (2000))。もう1つのアイソザイムである唾液CAVIは、二酸化炭素の形で過剰の酸を除去することによって粘膜表面を緩衝するために胃に飲み込まれる (同上)。加えて、CAIVは粘膜下毛細管の内皮細胞で発現しており、またミトコンドリアCAVは旁細胞およびG細胞で発現している (Fleming et al. (1995)、Saarnio et al. (1999))。しかし、個々のアイソザイムの意義およびそれらの胃形態形成および生理における相互作用は大部分が不明であり、それはまた対応する動物モデルが利用出来ないためでもある。唯一の例外はマウスで化学的突然変異誘発によって誘導した遺伝性CAII欠損である。それらの突然変異マウスは腎酸性化、成長遅滞、および血管の石灰化を被るが、胃の表現型は報告されていない (Lewis et al. (1998))。

したがって、Car9<sup>-/-</sup>マウスは炭酸脱水酵素欠損症の、遺伝子ターゲティングによって構築された最初の動物モデルに当たる。さらに、Car9遺伝子のターゲティング破壊の表現型上の結果は、細胞増殖/分化の調節および胃粘膜の全体性の保護におけるCA IXの重要で重複の無い役割を実証する。CA IXは明らかに、正常な胃形態形成および胃上皮内の動的ホメオスタシスの調整に必要である。これらの結論は、CA IXin正常ヒト胃粘膜におけるCA IXの高いレベル、および胃腫瘍細胞株および腫瘍においてin vivoで観察されるCA IXの発現低下と合致する (Pastorekova et al. (1997))。

要約すると、マウスにおけるCA IX完全欠失突然変異の解析は、このタンパク質の生物学的重要性を明らかにし、胃粘膜の形態形成におけるその役割を解明するための有用なモデルを提供した。実施例2で見られるように、CA IX-欠損マウスはまた、新規の一連のモノクローナル抗体に関する本発明の態様に不可欠であった。

#### 【0186】

##### 実施例 2

##### CA IX-欠損マウスから作製されたCA IX-特異的モノクローナル抗体

##### 材料および方法

##### 細胞培養

ハイブリドーマ細胞株は、10%FCS(BioWhittaker, Verviers, Belgium)、2mMグルタミン、および40  $\mu$ g/mlゲンタマイシン(Lek, Slovenia)を添加したDMEM培地中で37  $^{\circ}$ Cにて5%CO<sub>2</sub>を含む空気中で増殖させた。同一の培養条件を、CA IX抗原の起源として、または陰性対照としてのどちらかで使用した下記の細胞株に適用した:完全長ヒトCA9cDNAを永久的に遺伝子導入されたマウスNIH3T3線維芽細胞(NIH3T3-fICA IX)および対応する遺伝子導入試薬だけを与えたNIH3T3-neo対照 (Pastorek et al. (1994))、完全長CA9cDNAを遺伝子導入されたMDCK細胞(MDCK-fICA IX)および対応するMDCK-neo対照であるヒトHT29結腸癌細胞、およびCA IXを天然に発現するヒトHeLa子宮頸癌細胞、およびCA IXについて陰性であるC33a子宮頸癌細胞。

## 【0187】

免疫化目的で、24～48時間増殖させた細胞をPBSで2回洗浄し、剥離し、遠心分離によって回収し、適当な量のPBSに再懸濁した。最終追加免疫として、NIH3T3-fICA IX細胞を0.5MNaCl、0.5%オクチル-β-D-グルコピラノシド(Chemical Institute SAV, Bratislava, Slovakia)、0.1mMPMSF)から成るOCG抽出緩衝液を用いて30分間4℃にて抽出し、剥離し、5分間13000rpmにて遠心分離し、PBSに対して48時間4℃にて透析した。

## 【0188】

組み換えGST-CA IXタンパク質のクローニングおよび作製

CA IXのPGおよびCA細胞外ドメインをコードするcDNA断片(図5を参照)を、完全長CA9cDNAをテンプレートとして用いた特異的プライマーによって、個別にまたは一緒に増幅した。PGドメイン(aa52-125)(配列番号98)をコードする断片はPG3(センス)5'-TAG AAT TCG GCT CTT CTG GGGAAG AT-3'(配列番号99)およびPG4(アンチセンス)5'-ATA CTC GAGGG G TTC TTG AGG ATC TCC-3'(配列番号100)プライマーを用いて得られ、CAドメイン(aa121-397)(配列番号101)をコードする断片はCA5(センス)5'-TAGAAT TCG ATC CTCAAGA AC CCC AG-3'(配列番号102)およびCA6(アンチセンス)5'-AAT CTC GAG ACT GCT GTC CAC TCC AGC-3'(配列番号103)プライマーを用いて得られた。プライマーPG3とCA6の組み合わせを用いて、PG+CAドメイン(aa52-397)(配列番号104をコードするcDNA断片を作製した。

## 【0189】

結果として得られたPCR産物を、プライマー配列に挿入されたEcoRIおよびXhoI制限部位を介して、pGEX4T-1細菌プラスミド中にクローニングした。

## 【0190】

融合タンパク質GST-PG、GST-CA、GST-PG+CAを、標準的プロトコルを用いてE. coli菌株DH5で発現した(Gibadulinova et al. (1999))。先に作製した完全長融合GST-fICA IXタンパク質を平衡して産生した。タンパク質はグルタチオン-Sセファロース(Amersham Pharmacia)を用いたアフィニティクロマトグラフィーによって精製し、10mMGSH(還元型グルタチオン)で溶出した。得られたタンパク質は、MAb試験用の抗原として、または免疫化用の免疫原(GST-CA)として使用した。

免疫化

免疫化のために、Ortova Gut et al. (2002)によって作製され特徴づけられたCA IX-欠損マウスを8～10週齢の時に使用した。マウスに $5 \times 10^6$ 個のNIH3T3-fICA IX細胞を含む0.5mLのPBSを腹腔内(i.p.)注射した。3週間後、マウスはNIH3T3-fICA IX細胞の同じi.p.注射または $5 \times 10^6$ 個のHT-29細胞を含む0.5mLのPBSのi.p.注射を受けた。さらに3週間後、マウスは下記のいずれかで追加免疫した:(i)グルタチオン-Sセファロースと結合したGST-CAタンパク質100μgを含む0.5mLのPBSのi.p.(ii)100μg溶出GST-CAタンパク質を含む200μLのPBSの静脈注射(i.v.)、(iii) $5 \times 10^6$ 個のNIH3T3-fICA IX細胞を含む0.5mLのPBSのi.p.(iv)NIH3T3-CA IX細胞のOCG抽出物200μL。3日後に脾細胞を採集し、Sp2/0骨髓腫細胞と融合した。

Mabsの産生

免疫化マウス由来脾細胞とSp2/0細胞との融合はLane et al. (1986)に従って実施した。ハイブリドーマはDMEM-HAT培地中で選択した。CA IXに対する特異的反応性についてELISAによって下記の通り、上清をスクリーニングした。陽性ハイブリドーマ培養を、テラサキ・マイクロプレートを用いた限界希釈法によってクローン化した。クローン性ハイブリドーマ細胞株を拡大し、凍結-再凍結に供しCA IXに対する反応性について反復して試験した。Ey et al. (1978)によって記載された通り、ハイブリドーマ培地から、プロテインAセファロースCL-4B(Amersham Biosciences AB, ウプサラ、スウェーデン)に対するアフィニティクロマトグラフィーを用いて、多量の抗体を精製した。

## 【0191】

ELISAスクリーニング

陽性ハイブリドーマのスクリーニングはサンドイッチELISAによって実施した。マイク

10

20

30

40

50

ロプレートウェルを、PBSで1:10希釈したNIH3T3-fICA IX細胞のRIPA抽出物(後述)を用いて、および平行して陰性対照としてNIH3T3-neo細胞の類似の抽出物を用いて、一夜37℃にて被覆した。その後、被覆したウェルを、個々のハイブリドーマに由来する希釈していない培地とインキュベートした。ペルオキシダーゼ-標識ブタ抗マウスIgG(Sevapharma, プラハ、チェコ共和国)を検出剤として用いた。M75MAbを陽性対照として使用した。

#### 【0192】

ディファレンシャルELISAスクリーニングのためには、ウェルを下記の抗原で被覆した: 10ng/ウェルのGST-fICA IX、10ng/wellのGST-CA IX、PBSで1:10希釈したHeLa細胞のRIPA抽出物、PBSで1:10希釈したHT-29細胞のRIPA抽出物、そしてその後上記の通り分析した。

#### 【0193】

#### アイソタイプの決定

MAbアイソタイプは、アフィニティ精製ウサギ抗マウスIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、およびIgA抗体(マウスモノクローナル抗体アイソタイピング試薬, Sigma, St. Louis, 米国)を用いたELISAによって取扱説明書に従って決定した。

#### 免疫蛍光

スライドガラス上で増殖させた細胞を氷冷メタノール中で-20℃にて5分間固定した。非特異的結合は1%BSA含有PBSと30分間37℃にてインキュベートすることによって遮断した。その後、細胞を順次、0.5%BSA含有PBS(PBS-BSA)で希釈した一次抗体と1時間37℃にてインキュベートし、PBS-BSAで10分間、3回洗浄し、PBS-BSAで1:300に希釈した抗マウスFITC-結合ウマ抗体(Vector Laboratories, Burlingame, 米国)と1時間37℃にてインキュベートし、前と同様に洗浄した。最後に、細胞をスライドガラス上にCitifluor(Agar)を用いて封入剤中に封入し、対物レンズPlanFluor20x、40xを装備したNikonE400落射蛍光顕微鏡によって検鏡し撮影した。画像はNikon Coolpix 990によって取得した。

#### 【0194】

#### イムノブロッティング

コンフルエント単層で増殖した細胞を冷PBSで2回洗浄し、COMPLETEプロテアーゼ阻害剤混合物(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)を含む氷冷RIPA緩衝液(1%Triton X-100、1%デオキシコール酸、0.15MNaCl、pH7.2)中で30分間氷上にて可溶化した。抽出物を回収し、15000rpmで10分間4℃にて遠心分離によって清澄化し、-80℃にて保存した。抽出物中のタンパク質濃度はBCAタンパク質アッセイ試薬(Pierce, イリノイ州ロックフォード、米国)によって定量した。

#### 【0195】

総細胞抽出物(タンパク質50μg/レーン)を10%SDS-PAGEゲルで分離した。タンパク質をその後PVDF膜(Amersham Pharmacia Biotech, LittleChalfont Buckinghamshire, England)上に転写した。5%スキムミルクと0.2%NonidetP40を含むPBS溶液中でブロッキング後、MAbs(希釈していないハイブリドーマ培地)を用いて膜をプロービングし、洗浄して、1:500希釈した二次抗マウスHRP結合ブタ抗体(SEVAPHARMA, Prague, Czech Republic)で処理した。タンパク質バンドはECLキット(Amersham Pharmacia Biotech)を用いて増幅化学発光によって可視化した。

#### 細胞ビオチン化

10cmシャーレで増殖させた70%-80%集密の単層中の細胞を、氷冷した緩衝液A(20mM炭酸水素ナトリウム、0.15MNaCl、pH8.0)で洗浄した。使用直前に、1mgのNHS-LC-ビオチン(Pierce)を50μLのDMSOに溶解し、4mLの緩衝液Aと混合し、細胞に加えて60分間4℃にてインキュベートした。

ビオチン化後、細胞を緩衝液Aで5回洗浄し、上記の通り抽出した。

#### 【0196】

#### 免疫沈降

1mL量の培地中の被験MAbを、プロテインAセファロース(Pharmacia, ウプサラ、スウェーデン)のRIPA緩衝液中の50%懸濁液25μLに、2時間室温にて結合させた。ビオチン化細胞抽出物(200μL)を、プロテインAセファロースの50%懸濁液20μLで予備清澄化し、その後

10

20

30

40

50



に加えてMAbを結合させた。

#### 【 0 1 9 7 】

プロテインAセファロース上に回収された免疫複合体をWilliams et al. (1985) に従って洗浄し、Laemmli装填緩衝液中で5分間煮沸し、SDS-PAGEゲル(10%)電気泳動によって分離した。その後、タンパク質をPVDF膜上に転写し、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン(1:1000、Pierce)およびその後のECLを用いて検出した。

#### 【 0 1 9 8 】

##### MAbsのビオチン化

精製MAbsは、NHS-LC-ビオチン(Pierce)を用いて取扱説明書に従って標識化した。要約すると、pH8.0のPBSに溶解した2mgの精製IgGを、100 μgのNHS-LC-ビオチンと2時間氷上にてインキュベートした。遊離ビオチンは微量濃縮機(PALL Gelman Lab. ウィーン、オーストリア)またはゲル濾過を用いて除去した。

10

##### 競合抗体結合ELISA

NIH3T3-fICA IX細胞の抽出物を、標識MAbsの最大結合の50%に相当する濃度でマイクロプレートウェル上に吸着させた。被覆したプレートは、10%FCS含有PBSで洗浄し飽和させた。精製MAbsの30 μLでの10倍連続希釈および一定量のビオチン化MAbを含む30 μLを加え、一夜4 にてインキュベートした。プレートは洗浄し、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(Pierce)を検出剤として用いた。

#### 【 0 1 9 9 】

##### 結果

20

##### CA IXに対するモノクローナル抗体の作製および基礎的特徴づけ

マウスとヒトCA IXタンパク質のN末端配列の顕著な差異によって引き起こされるエピトープ選択を回避し、また他のタンパク質領域にもまた向けられたモノクローナル抗体を作製するため(図5)、我々は実施例1で作製したCA IX-欠損マウスを用いて新規のCA IX-特異的モノクローナル抗体を調製した(Ortova Gut (2002))。自身のCA IXタンパク質を発現しないマウスはヒトCA IX分子全体を非自己として認識し、体液性免疫を当該タンパク質のさまざまな部分に向けると仮定された。

#### 【 0 2 0 0 】

高濃度のCA IXを天然に発現するヒト細胞(HT29)、CA IXの異所性過剰発現を有するマウス細胞(NIH3T3-fICA IX)、および最後に、CA IX(GST-CA)のCAドメインに融合したグルタチオン-S-トランスフェラーゼから成る組み換えタンパク質の、異なる組み合わせについて5種類の免疫プロトコルを検討した。3種類のプロトコルが、CA IX-特異的MAbsの産生の成功に結びついた(表3)。

30

【表 3】

表3

CA IX-特異的ハイブリドーマの免疫化プロトコール、融合、および収量の概要。

融合番号	免疫化プロトコール <sup>a</sup>	クローン の総数	非特異的 <sup>b</sup>	MN-特異的ハイブリドーマ		
				開始数 <sup>c</sup>	サブクローン 数 <sup>d</sup>	安定
I	1.NIH 3T3-flCA IX i.p.	50	0	1	0	0
	2.NIH 3T3-flCA IX i.p.					
	3.NIH 3T3-flCA IX i.p.					
II, III	1.NIH 3T3-flCA IX i.p.	1700	50	60	6	0
	2.NIH 3T3-flCA IX i.p.					
	3.HT-29 i.p.					
IV	1.NIH 3T3-flCA IX i.p.	800	40	5	5	4
	2.NIH 3T3-flCA IX i.p.					
	3.OCGexNIH-CA IX i.v.					
V, VI	1.NIH 3T3-flCA IX i.p.	1220	17	9	6	2
	2.NIH 3T3-flCA IX i.p.					
	3.GST-CA IX i.p.					
VII, VIII, IX, X	1.NIH 3T3-flCA IX i.p.	4400	16	83	12	5
	2.HT-29 i.p.					
	3.GST-CA IX i.p.					
	合計	8170	123	158	29	11

<sup>a</sup>注射の順序、免疫原の種類、投与経路(i.p.: 腹腔内、i.v.: 静脈内)を含む  
免疫化プロトコールの簡単な説明

免疫原:

NIH 3T3-flCA IX-野生型CA9cDNAを安定に遺伝子導入されたマウスNIH3T3線維芽細胞

OCGexNIH-CA IX-OCG界面活性剤を用いて得たNIH 3T3-flCA IX細胞由来抽出物

HT-29-天然にMN/CA IXを発現しているヒト結腸直腸がん細胞

GST-CA IX-GSTに融合した、組み換え細菌MN/CA IXのCAドメイン

<sup>b</sup>未知の非CA IXマウスまたはヒト細胞タンパク質に対するMAbsを産生する非特異的ハイブリドーマ

<sup>c</sup>サブクローニングに成功したMN-特異的ハイブリドーマ

<sup>d</sup>最適の生存能力およびMN-特異的MAbsの安定した生産を有するハイブリドーマ

【 0 2 0 1 】

全体で、我々は10回の融合を行い8170種類のハイブリドーマをスクリーニングした。ELISAスクリーニングでCA-IX反応性抗体を産生した、最初に選択された158種類のハイブリドーマは、サブクローニング後に29種類のハイブリドーマへ、そして最終的に凍結-再凍

10

20

30

40

50

結後に 11 種類の生存能力を有し安定であるクローンへ絞り込まれた。これらの抗体のうち 7 種類が IgG2a アイソタイプ、2 種類の抗体が IgG1、および 2 種類が IgM アイソタイプであった(表4)。

【表4】

表4

M75と比較した新規CA IX-特異的モノクローナル抗体のアイソタイプおよび反応性の要約

抗原		N, HT, G	HT, HL, M	HT, HL, M?	M, HT
Mab	アイソ タイプ	ELISA	ブロッ ティング	沈降	蛍光
M75	IgG2b	+	+	+	+
IV/6	IgM	+	+	nd	+
IV/18	IgG2a	+	+	+	+
IV/14	IgM	+	—	nd	nd
IV/11	IgG1	+	—	—	+
V/10	IgG2a	+	—	+	+
V/12	IgG2a	+	—	+	+
VII/1 3	IgG1	+	—	—	—
VII/2 0	IgG2a	+	—	+	+
VII/2 8	IgG2a	+	—	+	+
VII/3 2	IgG2a	+	—	+	+
VII/3 8	IgG2a	+	—	+	+

比較のためにM75と共に、新規Mabsの反応性を下記の抗原を用いて調べた:

N-ヒトCA IXタンパク質を発現している遺伝子導入された  
マウスNIH3T3-flCA IX細胞由来の抽出物(陰性対照として対応する  
NIH3T3-neoと並行させて)

HT-高レベルのCA IXを天然に発現しているヒトHT-29細胞由来の抽出物

HL-高密度培養でCA IXを天然に発現しているヒトHeLa細胞由来の抽出物

G-組み換えGST-flCA IX融合タンパク質

M-遺伝子導入MDCK-flCA IX細胞(MDCK-neo対照と比較して)

【0202】

抗体は最初に、マウスおよびヒト細胞株で発現した完全長CA IX抗原に対するELISAで試験した。すべての抗体はNIH3T3-CA IX細胞およびHT-29細胞の抽出物と結合したが、対照NIH3T3-neo細胞およびC33aCA IX陰性ヒト子宮頸癌細胞とは結合しなかった。抗体はまたGST-CA IXタンパク質を認識したが、GST単独は認識せず、CA IXに対する特異性を支持した(表5)。

## 【表 5】

表5

CA IXの短縮型に対する反応性に基づくCA IX-特異的モノクローナル抗体の標的ドメイン

抗原	PGCA (G)	PG (G)	$\Delta$ CA (M)	$\Delta$ CA (M)	$\Delta$ PG (M)	標的ドメイン
Mab	ELISA		沈降	蛍光		
M75	+	+	Nd	+	-	PG
IV/18	+	+	Nd	+	-	PG
V/10	+	-	-	-	+	CA
V/12	+	-	-	-	+	CA
VII/20	+	-	-	-	+	CA
VII/28	+	-	-	-	+	CA
VII/32	+	-	-	-	+	CA
VII/38	+	-	-	-	+	CA

モノクローナル抗体のドメイン特異性は下記の抗体を用いて決定した:

PGCA(G)-GST-PGCA融合タンパク質として発現される、PGドメインおよび  
CAドメインの両方を含むCA IX分子のN末端部分

PG(G)-GST-PG融合タンパク質として発現されるPGドメイン

CA(G)-GST-CA融合タンパク質として発現されるCAドメイン

 $\Delta$ CA(M)-MDCK細胞においてCAドメインをコードする領域が欠失した導入cDNAから  
発現されるCA IXタンパク質の短縮変異体 $\Delta$ PG(M)-MDCK細胞においてPGドメインをコードする領域が欠失した導入cDNAから  
発現されるCA IXタンパク質の短縮変異体

## 【 0 2 0 3 】

間接免疫蛍光法は、調べた抗体のすべてが、遺伝子導入された極性化上皮細胞MDCKの細胞表面に局在した抗原と、およびCA IXを天然に発現するHT-29ヒト結腸癌細胞の細胞表面に局在した抗原と結合したことを示した。(細胞を集密まで増殖させ、メタノールで固定し、代表的モノクローナル抗体とインキュベートし、その後FITC結合抗マウス抗体とインキュベートした。すべての抗体は、使用した細胞株の両方で、細胞膜CA IX-特異的染色を示した。一次抗体を省き二次抗体だけで処理した細胞を陰性対照として用いた)。染色シグナルの分布は、M75によって可視化されたCA IXの分布と一致した。

## 【 0 2 0 4 】

特筆すべきことに、新規Mabsのうち2種類、すなわちIV/6およびIV/18、および以前のMabM75だけが、HT-29およびHeLa細胞にそれぞれ由来する天然に発現されたCA IXを用いた、およびMDCK細胞で異所性に発現されたCA IXを用いたイムノプロットングで反応した。IgG2アイソタイプの抗体はすべて、ビオチン化によって標識されたHT-29とHeLaヒト細胞の両方の抽出物に由来するCA IXを免疫沈降させることができた。(細胞を集密まで増殖させ、ビオチンで標識し、RIPA緩衝液で抽出した。CA IXは細胞抽出物から、材料および方法に記載の通り免疫沈降され、SDS-PAGEによって分離され、プロットされた。プロットはペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジンとインキュベートされ、ECLによって現像された)。それらはまた、MDCK細胞で異所性に発現されたCA IXタンパク質を免疫沈降させた。

## 【 0 2 0 5 】

### CA IXの組み換え変異体への抗体結合による標的ドメインの測定

最初の試験は、新規モノクローナル抗体のヒトCA IXに対する反応性を証明した。標的タンパク質ドメインを明らかにするため、我々は最良の性質を有する抗体を選択し、細菌で産生された組み換え変異体CA IXタンパク質および、NIH3T3およびMDCK細胞にそれぞれ遺伝子導入された短縮cDNAから発現された変異体CA IXタンパク質を用いて、別の一連の実験を実施した。(CA IXおよび遺伝子導入MDCK細胞で発現されたその欠失変異体 PGおよび CAの免疫蛍光検出を用いた。細胞を集密まで増殖させ、メタノールで固定し、新規モノクローナル抗体と、その後FITC結合抗マウス抗体とインキュベートした。抗体はその標的ドメインを含むCA IX変異体を発現している細胞でだけ細胞膜CA IX-特異的染色を示した)。表5に要約した結果は、新しく作製された抗体の1つ、すなわちIV/18は、M75と同様にPGドメインに対すると示す。

10

残りの6種類の抗体(すなわちV/10、V/12、VII/20、VII/28、VII/32、およびVII/38)は、完全長CA IXタンパク質を免疫沈降させる能力によってもまた確認された通り、CAドメインを標的とするが、その欠失変異体はCAドメインの大きな部分を欠いていない(CA IXはそれぞれ完全長CA IXタンパク質を発現しているMDCK細胞およびその CA変異株の抽出物から免疫沈降された。細胞は集密まで増殖させ、ピオチンで標識し、RIPA緩衝液を用いて抽出した。CA IXは細胞抽出物から、材料および方法に記載の通り免疫沈降され、SDS-PAGEによって分離され、プロットされた。プロットはペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジンとインキュベートされ、ECLによって現像された)。実際に、これらの試薬は、CA IX-欠損マウスは免疫優性PGドメインの外側の領域を認識するモノクローナル抗体の作製に適しているという概念実証を表す。

20

【0206】

### 競合結合による抗原性部位のマッピング

モノクローナル抗体によって標的ドメイン内に認識される、抗原性部位の相対位置を決定するために、我々は競合結合分析を実施した。ピオチン標識化精製抗体を、非標識競合抗体の漸増量の同時存在下で結合させた。非標識競合剤の存在下における標識抗体の結合の程度は、競合剤の非存在下における結合の百分率として表した。相同な対を含むすべての異なる対のMAbsの試験、および競合の程度によるそれらの分類は、抗体間の主な関係、その群分け、および群間を示す基本的なマップの精緻化を可能にした(図6)。マップは、M75およびIV/18抗体は別々の領域の重複する抗原性部位を認識することを示し、CA IXタンパク質のPGドメインに対するそれらの証明された特異性と合致する。CAドメインを標的とする抗体は3つのクラスターを形成する。MAbsの2つの対、すなわちそれぞれV/12対VII/20およびV/10対VII/32は、有意な相互競合を示し、2つの分離可能な抗原性部位内のそれらの重複したエピトープを示した。しかし、2つの抗原性部位関連クラスターそれぞれの1つのメンバーの間、すなわちV/10(標識)およびV/12(競合者)の強い一方的な競合が、その2つの部位がV/10とV/12MAbsに対応するエピトープを経由して部分的に互いの上に延長していることを示す。MABVII/38はCA IXのCAドメイン内の別の部位に属する。

30

【0207】

抗原性部位のマップは、捕捉-検出手法を用いたCA IX抗原の高感度免疫検出に適する、競合しない抗体の対を提案するためにさらに利用することができる情報を提供する。

40

【0208】

### 考察

癌組織との強い関連、および腫瘍進行において推定される機能的関与のために、CA IX関連の論文(Pastorek and Pastorekova(2003)に要約)の数が増えてゆくことによって証明されているように、炭酸脱水酵素IXは基礎および臨床研究の両方にとって興味深い対象となっている。

【0209】

これらの論文の大部分はCA IX-特異的モノクローナル抗体M75(Pastorekova et al.(1992))の使用に基づく。M75MAbは多数の重要なデータの獲得を促進してきているが、CA IXの一部の面は、M75とは独立した抗原性部位に対するモノクローナル抗体を含む、別の検

50

出手段無しには触れることができなかった。

我々はここで、融合およびハイブリドーマ作製のための免疫脾細胞のドナーとしてCA IXを欠損したマウスを用いた、そのような抗体の作製を記載する。特にM75標的ドメインの外側の配列におけるマウスタンパク質とヒトタンパク質の間の高い領域相同性とおそらく関係しているエピトープ選好性を除去するためにこの戦略を選んでいる (Ortova Gut et al. (2002))。CA IXを欠くマウスはまた、これらの領域を非自己と認識するという我々の仮定は、CA IXのCAドメインに対する6種類のモノクローナル抗体の産生によって認められている。興味深いことに、抗CA抗体の作製の成功に結びついた免疫化プロトコールは、CAドメインだけを含む組み換えCA IX変異体の、重要な3つめの投与成分としての注射を含む。代わりに、遺伝子導入されたNIH3T3細胞から抽出した完全長CA IX抗原の注射の結果生じた抗体のうち、MAbIV/18はM75と競合し、2種類の他の抗体(IV/6およびIV/14)もまたM75と同様にPG領域と結合するように見える。この経験は、ヒトCA IXの高度に相同な領域(CAドメインを含む)の免疫化マウスによる免疫認識を通常では妨げる内因性マウスCA IXタンパク質の非存在下でさえ、M75MAb-結合PGドメインは強力に免疫優性として挙動することを示唆する。見かけの免疫優性の理由は、N末端の説明および、高度に酸性であって4つの完全および2つの不完全ヘキサマー反復から成るPGドメインのアミノ酸配列の両方に存在するであろう (Opavsky et al. (1996))。これらの反復は潜在的には複数の結合部位を提供し(そしてMAbsの相対的親和性にも影響する)、この領域の一番N末端の位置は、CA IXの細胞外部分において、おそらく球形のCAドメインからの、空間的な突出を可能にするであろう (Pastorek et al. (1994))。

PGドメインのこれらの特性は、抗PGMAbsはイムノブロッティングで変性CA IXタンパク質を認識する一方、抗CAMAbsは認識しないという知見もまた説明できる。反復モチーフを持つ相対的に短いPGドメインは変性で害を受けない直線的な抗原性領域を構成する一方、立体構造的であると推定されるエピトープを有する大きなCAドメインのおそらく球形の構造は、完全に破壊されると推測することができる。この概念は、抗PGと抗CAの両方が、弱い界面活性剤を用いて抽出した未変性CA IX抗原、および遺伝子導入MDCK細胞の表面上の、メタノールで固定された抗原を免疫沈降させることができるという知見と合致する。そのような抗原は明らかに、直線的または立体構造的であるかどうかに関わらず、未変性エピトープを有する。

#### 【0210】

新規MAbsの全体を用いて実施した競合イムノアッセイによって説明された通り、CAドメインは3つの異なる抗原性部位を含み、うち2つは部分的に重複する。これらの部位の相対的な相互位置を示すことは可能である一方、CAドメイン上でのそれらの局在を予測するのは困難である。これらのMAbsの結合の喪失に伴った欠失の範囲に基づき、我々は、CA抗原性領域はCA IXのアミノ酸166-397(配列番号105)の範囲にわたると少なくとも結論することができる。しかし、その欠失が、CA欠失変異体では保存されたままであったアミノ酸135-166(配列番号106)上に部分的に位置する抗原性部位の切り離しに結びつくことは無視できない。

#### 【0211】

新規CA IX-特異的モノクローナル抗体の特徴は、その臨床用途の予見を可能にする。基礎研究において、これらの抗体はそれぞれPGおよびCAドメインの機能的寄与の研究のために重要な特異的試薬に当たる。CA IXのこれらの2種類の細胞外ドメインのそれぞれが、腫瘍進行の異なる側面と関連づけられてきている:酵素的に活性であるCAドメインは、腫瘍微小環境の酸性化に寄与すると考えられ、またPGドメイン(他のCAアイソフォームには存在しない)は、接着関連過程におけるその関与を決定すると信じられている。ここに開示する通りCA IX-欠損マウスにおいて作製されたMAbsを用いて、CA IXの欠失変異体または突然変異体の形で別々に発現されたこれらのドメインによって発揮される生物学的効果を識別することが可能になる。

#### 【0212】

にもかかわらず、新規MAbsの主な可能性は、それらの臨床用途である。さまざまな腫瘍

組織の多数の臨床研究が、特に腫瘍低酸素との密接な関連に関係して、CA IXの予知的および予後診断的価値を近年実証している (Loncaster et al. (2001); Chia et al. (2001); Giatromanolaki et al. (2001); Koukourakis et al. (2001); Hui et al. (2002))。この点では、新規MAbsをさまざまな状況下でのCA IX発現癌細胞の検出および/またはターゲティングに利用できるということは明らかである (vonMehren et al, 2003の総説の通り)。これらのMAbsの生物学的活性を調べるために設計された将来の実験はまた、HER-2/neu/c-erbB2およびEGFR癌蛋白に対するよく知られたMAbsと同じように、それらが抗体-媒介抗癌治療にとって何らかの意義があるかどうかを示す。また重要なことに、2つの別々の細胞外ドメイン上の異なる抗原性部位について特異的である競合しない抗体を利用できることは、癌患者の体液中のCA IXの検出に特に重要となり得る高感度分析法を作り出す機会を提供する。ここに開示し下記の実施例3に詳述する通り、CA IXの細胞外部分は腫瘍細胞表面から脱落し、癌患者の体液、特に血液および尿中に、免疫沈降によって検出することができる。本研究で記載する抗体の組み合わせに基づく迅速で信頼性の高い微量分析法の開発は、癌患者の非侵襲的モニタリングを潜在的に可能にすることができる。

#### 【0213】

要約すると、CA IX-欠損マウスを用いて作製され本稿で特徴づけられた抗ヒトCA IXモノクローナル抗体は、CA IX分子における構造-機能関係に関する我々の知識を改善するための、癌発生におけるCA IXの役割のよりよい理解のための、その臨床上の意味を解明するための、および生物材料中のCA IXの臨床的に意義のある検出のための、重要な手法に相当する。

#### 【0214】

##### 実施例3~10

下記の材料および方法は後述の実施例3~10で使用した。

##### 材料および方法

##### 細胞および腫瘍培養と培地

別に記載の無い限り、直腸結腸癌由来の細胞株HT29(DSMZACC299)、および腎明細胞癌由来のA498(ATCC No. HTB-44)は10%FCS(Gibco)添加D-MEMで増殖させた。実施例8では、HT29細胞は10%FCS(BioWhittaker)および160g/mlゲンタマイシン(Lek, Slovenia)を添加したダルベッコMEM培地(Biowhittaker, Verviers, Belgium)で培養した。A549肺癌細胞は、10%FCS(Globepharm)、L-グルタミンe(2pM)、ペニシリン(50IU/ml)、および硫酸ストレプトマイシン(50pg/ml)を添加したDMEM(Sigma)中で増殖させた。細胞培養は5%CO<sub>2</sub>を含む加湿雰囲気中で37℃にて維持した。腫瘍の短期培養には、新鮮な切除腫瘍を1mm片に切断し、PBSで洗浄し、10%FCS含有D-MEM(培地5mL中に新鮮重約50~100mgの腫瘍断片)を用いて懸濁し、5cmシャーレ中で37℃にて5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中でインキュベートした。細胞溶解緩衝液:1%IgepalCA-630(Sigma)、0.25%デオキシコール酸、およびプロテイナーゼ阻害剤を含むPBS (Zavada et al. (2000))。

##### 低酸素的に誘導したCA IXタンパク質組織培養の酸素再供給の効果

遺伝子発現の試験は、通常の増殖培地中で集密に達しつつあるA549肺癌細胞について実施した。正常酸素圧(5%CO<sub>2</sub>を含む加湿空気)および低酸素で、細胞の部分標本について平行してインキュベーションを行った。低酸素性条件は、Napco7001インキュベーター(Precision Scientific)で、0.1%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、および差量のN<sub>2</sub>を用いて作成した。酸素再供給実験は、細胞の低酸素への16時間の曝露とその後の正常酸素圧への指定時間の復帰によって実施した。

#### 【0215】

##### 患者血清および尿

すべての患者は定型的に超音波およびCTを手術前に受け、標準的な病期分類プロトコールに必要な情報を得た。これらの患者からの血清および尿は手術前および手術の5日後に得た。一部の患者では腎摘出後の腫瘍組織の試料を短期RCC培養に使用した。これらの患者すべてにおいて診断はRCCの組織学的発見によって確認された。18名の患者は対照となり、これらはRCC以外の泌尿器症状のために入院していた(感染症、尿路結石、他の泌尿器

腫瘍、など)。本研究は部門倫理委員会によって承認された。

健常供血者の血清は、血液学および輸血研究所(プラハ)のDr. Eva Hamsikovaから提供を受けた。

#### 【0216】

#### HT29細胞の異種移植片を有するヌードマウスに由来する血漿

雄性ヌードマウスCD-1nu/nu(Charles River, Germany)の側腹に $5 \times 10^5$ 個のHT29細胞を6~8週齢時に皮下注射した。注射の約2~3週間後に、ヘパリン化血漿試料を調製した;マウスの解剖および異種移植片の摘出の前に、血液を目からまたは心穿刺によって採取した。

#### 【0217】

#### 免疫学的試薬および方法

モノクローナル抗体: CA IX のPG 領域に特異的なM75が Pastorekova et al. (1992)によって作製されている;実施例2に記載の通り作製した、CAドメインに特異的なV-10。MAbM75のアイソタイプはIgG2bで、V-10はIgG2aである。

#### 【0218】

IgGはハイブリドーマTC液から前と同様にアフィニティクロマトグラフィーであるプロテインAセファロースCL-4Bカラム(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)によって精製された。M75の純度はSDS-PAGEによって確認した(Zavada et al. (2000))。

M75はHunter (1978)によって記載された通り、クロラミンT法を用いて $^{125}\text{I}$ で標識した。遊離の $^{125}\text{I}$ は、セファデックスG50カラム(Amersham Pharmacia Biotech)でのサイズ排除クロマトグラフィーによって除去した。放射性標識抗体の比活性は、トリクロロ酢酸によるBSAキャリアタンパク質と一緒に抗体の沈降後に測定した。

免疫反応性画分を決定するため、 $10^4$ cpmの $^{125}\text{I}$ -M75、3%BSAおよび0.05%Tween-20を含む100  $\mu\text{l}$ のPBSを、HT29細胞から抽出した抗原の漸増量で被覆した96ウェルプレートのウェルに加え、2時間37  $^{\circ}\text{C}$ にてインキュベートした。洗浄および2MNaOHを用いた細胞溶解の後に、Pharmacia LKB (Uppsala, Sweden)からのClinigammaカウンターを用いて、結合した放射能を測定した。非特異的結合が、100倍過剰なモル数の非標識 M75の存在下で測定され、総結合から差し引かれた。結果はLindmo et al. (1984)によって記載された通り解析した。

MAbsによってTC培地または細胞抽出物に由来するCA IX抗原と形成された免疫複合体の濃縮には、プロテインA-セファロース(Sigma#P-9424)を用いた;ヒト血清または尿由来のMAb-CA IX複合体は抗マウスIgG-アガロース(Sigma#A-6531)に吸着された。あるいは、我々は磁性ビーズ抗マウスIgG(Immunotech-Coulter#1181)を用いた。免疫ペルオキシダーゼ複合物M75-Pxは、ペルオキシダーゼ標識化キット(Roche Diagnostics #1829696, GmBH, Mannheim, Germany)を用いて作成した。

マウス血漿および細胞培地に由来するs-CA IXの免疫沈降は下記の通り実施した:HT29細胞の集密単層はPBSで洗浄し、新しい培地を加えた(10cmシャーレ当たり15mL)。18時間のインキュベーション後、培地を採集し、ポアサイズ0.22  $\mu\text{m}$ のフィルターを通して濾過した。細胞培地およびヘパリン化血漿の試料はプロテインA-セファロースCL-4B(Pharmacia Biotech)と予備インキュベートし、競合する可能性のあるウシおよびマウスIgGを、M75を用いた免疫沈降の前に除去した。免疫沈降は、1mlのヘパリン化血漿(PSで1:2に希釈)から、および3mlの細胞培養培地から、結合したM75MAbを有するプロテインAセファロースの懸濁液50  $\mu\text{L}$ と2時間室温にて緩やかに回転させてインキュベートすることによって実施した。

ヒト血清および尿由来のs-CA IXの免疫沈降は下記の通り実施した:0.75mlの血清または10mlの尿(ともに遠心分離によって清澄化した)に、2  $\mu\text{g}$ のM75IgGを加え60分間室温に置いた。この後、各試料に50%洗浄済み抗マウスIgGアガロースビーズ50  $\mu\text{l}$ を加え、懸濁液は回転機上で4時間または一夜、+4  $^{\circ}\text{C}$ にて攪拌した。その後、結合したマウスIgGおよび免疫複合体を有するビーズを遠心分離して(1200rpm/2分間)、沈澱を1mlのPBS-T(0.05%Tween 20含有リン酸緩衝生理食塩水、Sigma)に再懸濁し、上記の通り遠心分離して、ビーズは60  $\mu\text{l}$ のLaemmli試料緩衝液中で100  $^{\circ}\text{C}$ にて5分間加熱した。血清。沈澱は、M75-ペルオキシ

10

20

30

40

50



ダーゼ複合体およびECLを用いて現像したウェスタンブロットによって分析すると、s-CA IXp50/54の他に、92および125kDaの強い非特異的バンドを示した。これらの交差反応性タンパク質は対照ヒト血清中にも存在した。

#### 【0219】

我々は2種類の異なるモノクローナル抗体を用いることによってその非特異的バンドを除去することができた。免疫沈降にはCAドメインに特異的なMAbV-10を用い、一方、PGドメインに特異的なM75-ペルオキシダーゼ複合体をブロットの現像に用いた。M75を用いて得られた沈澱を装填したレーンだけが、50および54kDのCA IXバンドの他に、ヒト血清タンパク質との92および128kDaの交差反応を示す。新規非M75MAbsを免疫沈降に用いたレーンは、スキャンまたはフィルム上に見える交差反応は示さなかった。

10

ヒト血清から免疫沈降させたCA IXが出会った別の問題は、ウェスタンブロットがにじみおよび曇りで汚れて見えたかまたは曖昧に見えたことであった。我々は、これはペルオキシダーゼと結合させる間におけるM75-IgGの部分的変性が原因であると考え、我々は、取扱説明書の条件下で活性化されたペルオキシダーゼと結合させたM75IgGが、1分子のIgGに対してPx(ペルオキシダーゼ)5分子が結合したものよりも数倍大きなオリゴマーを形成したことをHPLCを用いて見出した。したがって、我々はPx:IgG比を3倍に減らして、ヒト血清由来の免疫沈降物とのウェスタンブロット上で綺麗なバックグラウンドを与える複合体を得た。

#### 【0220】

#### 免疫組織化学

20

実施例9におけるモノクローナル抗体M75を用いるCA IX免疫染色は記載された通りであった(たとえばWykoff et al. (2000)に)。スライド標本は2名の観察者によって観察された。CA IXスコアは(i)CA IXについて染色した腫瘍細胞のパーセンテージと(ii)その染色の1(強度最小)から3のスケール上での平均強度との積から算出した。

#### 【0221】

#### ELISA

「サンドイッチ」はMaxiSorpストリップまたはプレート(NUNC、デンマーク)中のこれらの層から成る:(1)固定化相:50mM炭酸緩衝液(pH9.6)中に5µg/mlで溶解させたMAbV-10 IgGを3時間室温にて吸着させた;(2)1% FCS含有PBSを用いた被験抗原希釈液を一晩、4℃にて吸着させた;(3)1% FCS含有PBSを用いたM75-Px複合体の1:5000希釈液を2時間室温にて結合させた;(4)100mMリン酸/クエン酸緩衝液(pH5.0)中に1mg/mlで溶解させたオルトフェニレンジアミン(OPD、Sigma)+1µl/mlの30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(Sigma)、を30分間暗所で室温にて反応させた。各工程後にストリップまたはプレートはPBS-Tで4回洗浄した。

30

#### 【0222】

#### イムノブロット

SDS-PAGEおよびウェスタンブロッティングは以前に記載された通りであった(Zavada et al. (2000))。全細胞タンパク質抽出物は組織培養細胞から、変性条件での10秒間のホモジナイゼーションによって調製した(Wiesener et al. (1998))。部分標本をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、イモビロンP膜(ImmobilonTM-P, Millipore, Bedford, UK)に転写した。CA IXはマウスモノクローナル抗ヒトCA IX抗体M75(1:50)を用いて記載された通り検出した(Pastorek et al. (1992))。実施例3~7および10については、HRP結合ヤギ抗マウス免疫グロブリン(DAKO)(1:2000)を1時間室温(RT)にて用いた。ECLプラス(Amersham Pharmacia)を視覚化に用いた。実施例8については、細胞(それぞれ、細胞単層、および腫瘍ホモジネートの沈殿物)はRIPA緩衝液(1%TritonX-100、0.1%デオキシコール酸ナトリウム、1mMPMSF、20µg/mlトリプシンインヒビター、1mMEチレンジアミン四酢酸を含むPBS)によって30分間室温にて抽出した。抽出物はその後遠心分離し(15分間13,000rpmにて)、タンパク質の濃度はBCAアッセイ(Pierce)によって取扱説明書に従って測定した。抽出物(タンパク質30gを含む部分標本)は直接分析した。培地および血漿はまず、M75MAbを用いた免疫沈降によって上記の通り濃縮した。試料は電気泳動によって10%SDS-PAGEゲル上で分離し、上記の通り膜にブロットした。膜は<sup>125</sup>I標識M75MAbと

40

50

インキュベートし、その後X線フィルムに焼き付けた。

【0223】

#### 実施例 3

##### 細胞培養中の細胞結合型および可溶性CA IX

ウェスタンブロット分析を実施して、培地中のCA IX(可溶性CA IX)または細胞抽出物中のCA IX(細胞結合型CA IX)を上記の通り測定した。

【0224】

以前に記載された通り、さまざまなヒト腫瘍細胞株が、高密度に増殖した場合、ウェスタンブロット上で「対」タンパク質p54/58として観察されるCA IXを産生する(Pastorekova et al. (1992); Zavada et al., (1993))。現在の結果はこれらの報告と合致する:直腸結腸癌細胞株HT29に由来する細胞抽出物はウェスタンブロット上でCA IXの54および58kDaのバンドを示す。これらの細胞培養に由来する培地もまたCA IXを含むが、その可溶型はいくぶん短く、50および54kDaの2本のバンドである。細胞抽出物中のCA IXの総含量は、ELISAによって測定したところ、培地中より約10倍高い(図10)。

【0225】

#### 実施例 4

##### 腫瘍抽出物中およびRCCの短期培養の培地中のCA IX

本試験には、新たに診断されたRCCを有する患者50名(男性28名、女性22名、平均年齢63.2歳、範囲36~79歳)が参加した。RCC腫瘍由来の抽出物のウェスタンブロットは、腫瘍細胞培養のプロットに似た。それらはまた54および58kDaの2本のバンドを含み、総タンパク質当たりのCA IXの割合はHT29細胞で見られるよりもいくらか低い(図10)。6検体すべてのRCC腫瘍抽出物は強いCA IX陽性であった。対照の腎臓および非RCC腫瘍は、血管脂肪種であるが、CA IXを全く含まない。

s-CA IXの脱落を短期培養において調べた:患者からの新鮮な切除腫瘍を1mm片に切断し、10%FCS含有D-MEM中で短期培養として上記の通り培養した。腫瘍断片の懸濁培養から培地を2日後に採取し、ウェスタンブロッティングおよびELISAによって分析した(図10)。ここでも、s-CA IXの濃度とM<sub>r</sub>の両方が、腫瘍細胞株HT29の培養と同等であった(50および54kDaの2本のバンド)

#### 実施例 5

##### 希釈したHT29細胞抽出物またはTC培地からのCA IXの50および58kDaバンドの回収

RCC患者の血清中および尿中のCA IXの濃度は低すぎて、予備的な濃縮無しでは測定できない。したがって、我々はまずHT29細胞の細胞抽出物またはTC培地から効率的に免疫沈降する方法を試験した。

【0226】

免疫沈降は上記の通り実施した。結果はいくぶん不可解であった。元のHT29細胞抽出物またはTC培地は、CA IXの2本のバンドを含んだ。しかし、M75抗体の添加、次いでPA-セファロースの添加と低速遠心分離の後、CA IXは上清中に検出されず、そしてすべてのCA IX抗原は沈澱中に存在した。驚くべきことに、それは細胞抽出物に由来した(細胞結合型CA IX)かまたは培地に由来した(可溶性CA IX)かにかかわらず、54kDaの1本のバンドとしてだけ観察された。もう一本のバンドは消失した。沈澱を対応する上清と混合した場合、失われたバンドは元の強度で再び出現した。失われたバンドの再出現のためには、FCSを終濃度1~2%で添加するので十分であった。この観察は、FCS(または他のさまざまなタンパク質)がCA IXにある種の立体的な支持をウェスタンブロット上で提供していることを示唆する。この実験では、p54バンドはMAbおよびプロテインAセファロースの添加と遠心分離の後に消失せず、それはPAGEにおける移動に際してp54バンドがM75IgG.の変性した重鎖と重なるためである可能性が非常に高い。この観察以来、我々は、ICA IXを免疫沈降物から抽出するためおよび試料をゲル電気泳動およびウェスタンブロッティングの前に希釈するためのLaemmli試料緩衝液に1.5%FCSを加えている。我々は、ウェスタンブロット上のCA IX抗原の高感度検出には、CA IXと交差反応しない他の「夾雑」タンパク質の存在が必要であると結論する

## 実施例 6

### RCC患者の血清中のCA IX

実施例3～5に記載された通り、細胞または腫瘍に由来する抽出物中、および培地中のCA IXタンパク質の検出および定量には問題はなかった。CA IXの濃度はウェスタンブロッティングによるかまたはELISAによる直接分析に十分であった。対照の細胞抽出物または培地は、偽陽性または非特異的バンドを示さなかった。

#### 【0227】

問題は我々がヒト血清の試験を始めた時に出現した。CA IXの濃度は低すぎ、正常血清タンパク質の濃度は高すぎて、直接のゲル分離はできなかった。したがって、我々はM75、次いで抗マウスIgGアガロースビーズを用いて、対照および患者血清から免疫沈降物を調製した。沈降物は、M75-ペルオキシダーゼ複合体およびECLを用いて現像したウェスタンブロットによって分析した場合、s-CA IXp50/54バンドの他に92および125kDaの強い非特異的バンドを示した。これらの交差反応性タンパク質は対照ヒト血清中にも存在した。

#### 【0228】

幸い、上記の通り、我々は2種類の異なるモノクローナル抗体を用いることによってその非特異的バンドを除去することができた。免疫沈降にはCAドメインに特異的なMABV-10を用い、一方、PGドメインに特異的なM75-ペルオキシダーゼ複合体をブロットの現像に用いた。

#### 【0229】

我々は、RCC患者由来の血清30検体、RCC以外の腫瘍の患者の血清14検体、さまざまな尿路疾患に罹患した非腫瘍患者の血清6検体、および健常供血者の血清42検体を試験した。陽性と評価された血清は主にRCC群に見られた。RCC血清全30検体のうち、12検体が「陽性」と記録された(40%)。RCC群は1例の肉腫型RCCを含み、それはCA IX陽性であった。14例の非RCC腫瘍患者のうち、1例が陽性であった(乳頭状癌)。

#### 【0230】

腫瘍の大きさと血清中のCA IXの存在またはその濃度との間に明らかな相関は無いように見えた。健常供血者の血清を含む、「陰性」と評価されたすべての血清は、実際に極めて弱いs-CA IXの50kDaのバンドを示し、それはブロットを長く露光して初めてよく見えるようになった。

#### 【0231】

RCC患者および対照の血清中の可溶性CA IXタンパク質のウェスタンブロット分析については、各レーンに元の血清の0.6mlに相当する免疫沈降物を装填した。血清試料は下記に由来した、健常供血者3名:尿道結石を有した患者1名(100);非RCC腫瘍の患者:(39)腎細胞由来乳頭状癌、(103)腎盂の尿路上皮腫瘍、(121)肉腫様腎癌;他のすべての試料,RCC(最大のものは、番号68、2350cm<sup>3</sup>;番号36、1466cm<sup>3</sup>;番号50、725cm<sup>3</sup>;最小のものは、番号102、9cm<sup>3</sup>;番号112、14cm<sup>3</sup>)。

#### 【0232】

腫瘍由来の血中s-CA IXの推定される起源についてより多くの裏付けを得るため、我々は、腎摘出術の前後のRCC患者に由来する、対になった血清をいくつか試験した。実際、3例で手術後の血清は対応する術前の血清よりはるかに少ないs-CA IXを含んだ。1つの例外は患者番号68であって、s-CA IX濃度の上昇を示したが、しかしこの患者は姑息的手術だけを受けた。s-CA IXの中程度の減少だけが患者番号104で見られた;彼の場合では術後の試料は腎摘出術のわずか1日後に採取された一方、他のすべての患者では術後の試料は手術から7日後に採取された

## 実施例 7

### RCC患者の尿中のCA IX

RCC患者(上記の実施例6を参照)はs-CA IXタンパク質を尿中に排泄する。明白な理由で、我々は抗原を10mlの尿から(または必要ならより大きな量から)濃縮することができ、ゲルの1レーンに8mlに相当する部分試料を装填することができた。ウェスタンブロット分析用として、非腫瘍患者番号45および48は尿道結石を有した;非RCC腫瘍患者番号28およ

び57は血管脂肪種を有し、番号39は乳頭状癌を有した。他のすべての試料はRCCの患者に由来した(最大の腫瘍は番号36、1466cm<sup>3</sup>;番号50、725cm<sup>3</sup>;最小のものは、番号44、1cm<sup>3</sup>;番号60、12cm<sup>3</sup>;および番号38、14cm<sup>3</sup>)。

#### 【0233】

我々の結果は、患者の比較的高い割合(19/27=70%)がCA IXを尿中に排泄することを示す。s-CA IXタンパク質のM<sub>r</sub>は血液中とほぼ同じである(実施例6を参照)。一部の尿試料で、中間の大きさの余分のバンドが存在する。2つの強陽性検体(番号50および54)で、62kDaの余分のバンドが存在する。健常人25名に由来する尿の対照標本、非腫瘍2名および非RCC腫瘍泌尿器患者3名由来の尿はすべてCA IX陰性であった。

#### 【0234】

実施例3および4に示す通り、CA IXの脱落は中等度に効率的である。培地交換の2日後に、培地は細胞単層と比較してCA IXの総量の約10%を含む(図10)。一方RCC患者の血液中のs-CA IXの濃度は、患者が非常に大きい腫瘍を有する場合でも、TC培地中より約1000倍低い(表6)。このことは、s-CA IXが血液から迅速に除去されることを示す。クリアランスにはいくつかの機構が存在するであろう。我々はそのうちの1つを実証している:大きな分解無しの尿中への排泄。s-CA IXの尿中濃度は血中の抗原に概ね対応する。おそらく、CA IXの一部はより小さな断片に分解されるであろう;我々はPGドメインを欠く20~30kDaのCA IX関連ポリペプチドの存在を把握している。しかしその高感度検出および定量は分析条件の最適化を必要とし、おそらくCAドメインに対するCA IX-特異的mabsを用いる二抗体サンドイッチアッセイである。2つの尿検体-番号50および54は、MAbM75と反応する、より大きな62kDaのタンパク質を含む。このより大きなタンパク質の意義は不明である;それは同一患者由来の血液中または腫瘍抽出物中には見つからなかった。

#### 【0235】

実施例3~7で試験した生物材料中のCA IX濃度に関するデータを下記の表6に要約する。

#### 【表6】

表6  
生物材料中のCA IXの濃度

HT29細胞抽出物*	4mg/g総タンパク質
新鮮RCC抽出物	0.5~2mg/g総タンパク質
正常腎臓抽出物	検出不可
HT29TC培地*	100ng/ml
RCCTC培地	100ng/ml
RCC患者の血清	20pg~3.6ng/ml
対照血清	5~25pg/ml
RCC患者の尿	20pg~3ng/ml
対照尿	0~2pg/ml

\*5cmシャーレは、培地5ml、または細胞単層から抽出された総タンパク質0.5mgに相当する。

#### 【0236】

観察された濃度は幅広い。細胞および腫瘍抽出物について、およびTC培地についての結果はELISAに基づく。血清中および尿中のCA IX濃度は、ウェスタンブロットを用いて露光したフィルムのデンストメーター測定によって測定し、ELISAで滴定したHT29培地を用いた内部校正との比較によって計算した。高い生物学的変動のため(細胞培養におけるCA IXの密度依存性発現、CA IX測定用の尿を提供する前に患者が摂取した液体の量)、すべてのプロットは概算値としてのみ捉えなければならない。ウェスタンブロットは半定量法に過ぎず、抗原の「正常」と「高」濃度の間に明確な境界線は存在しない。

#### 【0237】

### 実施例 8

#### HT29培養の培地中およびHT29細胞の異種移植片を有するヌードマウスの血清中の可溶性CA IX

HT29培養の培地中およびHT29細胞の異種移植片を有するヌードマウスの血清中の可溶性CA IXの出現を比較した (Chrastina et al. 印刷中(2003))。本実験では、上記の通り、我々はHT29ヒト結腸直腸癌を異種移植された胸腺欠損ヌードマウスを用いた。<sup>125</sup>I-M75ma bを用いたウェスタンブロッティングは、異種移植片中およびin vitroのHT29培養中のCA IXのレベルを示した。培地中および血漿中に脱落した可溶性CA IXはまず免疫沈降によって濃縮され、次いでウェスタンブロッティング分析に供された。

【0238】

ウェスタンブロット 分析は、HT29 異種移植片におけるCA IXのin vivo発現は培養よりも低いことを示し、おそらく腫瘍実質を取り囲むCA IX陰性間質の存在、および上述の通りの腫瘍細胞における発現の不均一性が原因である。さらに、細胞膜からの抗原の脱落の結果として、タンパク質の細胞外部分(s-CA IX)に相当する大きさのCA IX分子の部分集団が、培地中および血液循環中の両方で検出された。

【0239】

### 実施例 9

#### 膀胱癌切片におけるCA IXの発現

表在性および浸潤性の膀胱癌におけるCA IXの発現パターンが免疫組織化学方法によって比較されている (Turner et al., Br. J. Cancer, 86: 1276-1282 (2002))。CA IXの発現は膀胱癌標本で促進され、表在性腫瘍で浸潤性 腫瘍よりも大きく、尿路 腫瘍を検出するためのマーカー候補としてのCA IXを確認した。

【0240】

標準的な外科腫瘍学プロトコールによって採取した、ホルマリン固定パラフィン包埋組織標本はPathology Department, John Radcliffe Hospital, Oxford, UKから得た。正常膀胱の試料は死後臓器提供者から腎尿管切除術と同時に採取した。

CA IX発現は免疫化学によって連続切片について22例で(表7)、上記の通り評価した。これらの22例はヒト膀胱腫瘍および2試料の正常膀胱の病期および悪性度の範囲を代表するように選択された。17例で、CA IXは腫瘍の内腔表面および侵襲性腫瘍の腫瘍壊死領域の周囲で最大に発現していた。さらに、表在性腫瘍と浸潤性腫瘍の両方が内腔での促進を示した一方、これは表在性腫瘍ではるかに顕著であった。CA IXは正常膀胱 標本で検出されず、CISが摘出された患者に由来する試料中でも検出されなかった。

本実験の表在性膀胱癌におけるCA IX発現の高い頻度および顕著な促進は、正常な移行上皮が相対的に存在しないこと、およびCA IXは膜貫通タンパク質であるという事実と相まって、尿中の脱落タンパク質の測定は再発のマーカー候補になり得ることを示唆する。

10

20

30

## 【表 7】

表 7  
ヒト膀胱がんにおけるCA IXタンパク質の発現

患者	腫瘍病期／悪性度	CA IX免疫染色
1	CIS	陰性
2	Ta G1	内腔性
3	Ta G1	内腔性
4	Ta G2	内腔性
5	T1 G1	内腔性
6	T1 G2	内腔性
7	T1 G2	内腔性
8	T1 G2	内腔性
9	T1 G2	内腔性
10	T2 G2	内腔性および壊死周辺性
11	T2 G2	内腔性および浸潤性腫瘍
12	T2 G3	内腔性
13	T2 G3	内腔性
14	T2 G3	内腔性しかし希薄
15	別の生検でT2 G2、CIS	壊死周辺性CIS陰性
16	別の生検でT2 G2、CIS	壊死周辺性CIS弱陽性
17	T2 G2	内腔性および壊死周辺性
18	T2 G3	内腔性および壊死周辺性
19	T2 G3	浸潤性腫瘍
20	別の生検でT2 G3、CIS	内腔性および壊死周辺性CIS陰性
21	T3 G3	陰性
22	別の生検でT4 G3、CIS	内腔性、CIS弱陽性

連続切片において、モノクローナル抗体M75を用いた免疫化学分析でCA IXの発現を評価した。

## 【0241】

## 実施例 10

## 低酸素および酸素再供給に対するCA IX発現の一時的関係

低酸素によって誘導されたCA IXタンパク質は、酸素再供給の後でさえ、組織培養中に72時間存在することが示され、バイオマーカーとしての潜在的有用性をさらに支持する(Turner et al., (2002))。以前に、浸潤性膀胱癌細胞株におけるCA IXの低酸素性誘導は検出されていなかったが(Wykoff et al. (2000))、それは浸潤性腫瘍においてCA IX発現が低レベルであることが観察されたことと合致する。ヒト表在性膀胱腫瘍に由来する現在入手可能な細胞株は無いようである。それらの理由で、CA9遺伝子の顕著な低酸素性誘導を示すA549肺癌細胞株をこの実験用に選択した。A549肺癌細胞中のCA IXタンパク質の発現のウェスタンブロット分析を、低酸素性条件下での増殖後、およびその後の酸素再供給の後に実施した。検出されたCA IXタンパク質のレベルは少なくとも72時間一定のままであり、当該タンパク質が相対的に長い期間にわたって組織中に残存し得ることを示した

## 実施例 11

## 乳房の正常、良性および悪性組織におけるCA IX発現と、ER、C-erbB-2(HER-2/neu)、C-erbB3、およびCD44発現の比較

## 材料および方法

## 組織標本

乳房組織標本は、患者111名(平均年齢50.4歳、範囲19~82歳)から外科治療中に(KP)、D

10

20

30

40

50

partment of Obstetrics and Gynaecology, School of Medicine, Comenius University, Bratislavaにて1998～1999年に採取した。患者は手術前に抗腫瘍療法を受けていなかった。すべての組織の部分をホルムアルデヒドで固定し、パラフィンワックスに包埋し、定型の組織化学検査用に処理した。標本は重複する2群に分け、患者36名の組織がIHCだけによって分析され、患者36名の組織はIHCとRT-PCRの両方に供し、患者39名の組織がRT-PCRだけに用いられるようにした。IHCはパラフィン包埋標本を用いて実施した。RT-PCRについては、新鮮組織を液体窒素中で急速冷凍し、RNA抽出に使用するまで-80℃にて保存した。

#### 【0242】

##### 病理組織学

組織の病理組織学的評価を独立して実施した。診断は、IHCに供した切片について、およびRT-PCRで分析される組織に対応する標本について、別々に評価した。組織はWHO分類(世界保健機関1981)に従って分類し、正常(外科的腫瘍標本の離れた範囲に由来)、良性(線維囊胞性変化、線維腺腫、およびその他の型)、および悪性(in situ癌および浸潤性癌)に類別した。

##### 免疫組織化学

以前に記載された通り(Pastorekova et al. 1997)、組織切片はビオチン-ストレプトアビジン複合法によって、CA IXのN末端ドメインに対するモノクローナル抗体M75を使用して1:10希釈で1時間室温にて用いて免疫染色した。要約すると、本プロトコールは下記の通り実施した:(1)非希釈ウシ初乳乳漿を用いた40分間の切片の前処理およびリン酸緩衝生理食塩水(PBS)での洗浄。(2)1%ウシ血清アルブミン(BSA)含有PBS中でM75モノクローナル抗体と1時間のインキュベーション。(3)1%BSA-PBSで1:300希釈したビオチン化ヤギ抗マウスIgG(Dakopatts, Copenhagen, Denmark)と1時間のインキュベーション。(4)PBSで1:500希釈したペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン(Dakopatts)と30分間のインキュベーション。(5)ジアミノベンジジン溶液(Fluka, Buchs, Switzerland)中で2分間の可視化。切片は、工程2、3、および4の後、3回、10分間、PBSで洗浄した。すべてのインキュベーションおよび洗浄は室温にて実施した。切片はヘマトキシリンで対比染色し、Permount(Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ(米国))に封入し、NikonEclipseE600(東京)顕微鏡を用いて検鏡し撮影した。染色の程度は盲検法で記録し、シグナル強度、低倍率および高倍率下での染色のパターンおよび範囲を考慮に入れた。正常ヒト小腸の切片を陽性対照として用いた。陰性対照には、M75抗体をPBSで置き換えた。染色強度は、下記の0～3のスケールを用いて記録した:0、無反応;1、弱い反応;2、中程度の反応;3、強い反応。染色パターンは細胞質性または膜性として評価し、陽性は細胞膜染色を示した標本にだけ割り当てた。染色の範囲は、まばらな単独の細胞または小さい群の細胞が陽性であった場合は限局性として、または、連続的なまたは広範囲の部分が染色した場合は散在性として評価した。

#### 【0243】

##### RNA抽出およびcDNAの逆転写

凍結乳房標本からの総RNAの抽出は、Trizol溶液(GIBCO, Life Technologies)中で組織を破壊することによって実施した。RNAはエタノールで沈澱し、水に溶解し、ピロ炭酸ジエチル(DEPC, Sigma)で処理し、SuperScriptII逆転写酵素(GIBCO, Life Technologies)でoligo(dT)<sub>12-18</sub>(500 μg/ml)を用いて逆転写した。1 μgの総RNAを含む5 μlのRNaseフリー滅菌水を、各0.5 mM濃度のdNTPs(Pharmacia)、および6 mM MgCl<sub>2</sub>、40 mM KCl、1 mM DTT、0.1 mg/ml BSAおよび50 mM Tris-HCl, pH 8.3を含む逆転写酵素緩衝液から成る反応混合物に加えた。終容量20 μlの混合物を10分間70℃にて加熱し、氷上で急冷し、200 Uの逆転写酵素を添加し、1時間42℃にてインキュベートし、15分間70℃にて加熱し、使用まで-80℃にて保存した。

#### 【0244】

##### PCR増幅

PCR反応は、自動DNAサーマルサイクラー(BIORAD)で、CA9に対する、および内部標準と

10

20

30

40

50

して  $\alpha_2$ -ミクログロブリン( $\alpha_2$ -m)に対するcDNA-特異的プライマーを用いて実施した。プライマーのヌクレオチド配列は、対応する位置およびデータベース登録番号を括弧内に示し、下記の通りであった。:CA9(X66839): MN1 5'CCGAGCGACGCAGCCTTTGA 3'(1188-1207)(配列番号107)、MN2 5'TAGTCGACTAGGCTCCAGTCTCGGTACCT 3'(1443-1414)(配列番号108);  $\alpha_2$ -ミクログロブリン(AF072097):B2M1 5'CATCCAGCGTACTCCAAAGA 3'(860-879)(配列番号109)、B2M25'GACAAGTCTGAATGCTCCAC 3'(1024-1005)(配列番号110)。

乳癌マーカーER、c-erbB2、c-erbB3、およびCD44とCA IXの発現を比較するために、下記のプライマーを用いた平行する半定量RT-PCR反応と同一のテンプレートを使用した:エストロゲン受容体(M12674):ER1 5'ACTCGCTACTGTGCAGTGTGCAATG 3'(776-800)(配列番号111)、ER2 5'CCTCTTCGGTCTTTTCGTATCCAC 3'(1014-990)(配列番号112); c-erbB-2 (M11730): EB2-1 5'AGTTTCCAGATGAGGAGGG CGCATGCC 3'(1994-2020)(配列番号113)、EB2-2 5'TTCTCCCCATCAGGGAT CCAGATGCCC 3'(2384-2358)(配列番号114); c-erbB-3 (M34309): EB3-1 5'GGTGCTGGGCTTGCTTTTCAGCCTGG 3'(222-247)(配列番号115)、EB3-25'ACCACGCGGAGGTTGGGCAATGGTAG 3'(512-487)(配列番号116); CD44 (M59040.1): CD44-1 5'GGGTCCCATACCACTCATGGA TCT 3'(725-748)(配列番号117)、CD44-25'GGGAAAGGTTGGCGATCAGGAATA 3'(1444-1421)(配列番号118)。

反応混合物は1  $\mu$ gのRNAから得られたcDNAテンプレートの1/40、分析対象遺伝子および  $\alpha_2$ -mの両方について上流と下流の両方のプライマー各15pmol, 0.2mMの各dNTP(Pharmacia)、1UのTaqDNAポリメラーゼ(Boehringer Mannheim)およびPCR緩衝液(10mMTris-HClpH8.3, 50mMKClおよび1.5mMMgCl<sub>2</sub>)、総体積25  $\mu$ lから成った。95℃にて1分間の最初の変性後、増幅プログラムは下記の通り設定した: 95℃にて20秒間変性、65℃にて30秒間アニーリング、そして72℃にて40秒間伸長、合計30サイクル、そして最後に5分間72℃にて。これらの条件では、増幅産物は対数期で2組のプライマーについて得られ、同時増幅によって得られたPCR産物の収量は、別々の試験管で個別の増幅によって得られたのと同様であった。腫瘍検体の他に、陰性および陽性対照を、平行して体系的に処理した。

#### 【0245】

##### RT-PCR産物の半定量

20  $\mu$ lのRT-PCR産物を1.8%アガロースゲル上で泳動した。PCR産物の定量はScion Imageソフトウェアを用いて行った。CA9-特異的PCR産物は内部標準のパーセンテージで発現していた。CA9産物の量が内部標準の10%以下であった場合、標本は0に分類され、 $\alpha_2$ -mの11-50%は1、51-80%は2、および80%より大は3に分類される。遺伝子特異的産物の相対比での同様の半定量法を、データをさらに類別することなく他のマーカーについて用いた。

#### 【0246】

##### 統計的評価

乳癌におけるCA9の発現とER、c-erbB2、c-erbB3、およびCD44の発現との間の関連を、カイ二乗独立性検定によって(またはフィッシャーの正確確率検定によって)、同一の標本についての平行するRT-PCR分析で得られたデータを用いて評価した。陽性標本に適用したMann-Whitney順位検定を用いて、悪性組織のCA9-陰性部分集合に対してCA9-陽性部分集合における各マーカーの発現レベルを評価した。有意水準p = 0.05を両方の検定で用いた。

#### 【0247】

##### 結果

##### 乳房組織の免疫組織化学分析

CA IX発現のIHC分析に供された72検体の乳房標本の組は、正常組織10検体、良性病変36検体、および悪性腫瘍26検体から成った(表8)。良性病変は、線維囊胞性変化の20標本、6例の線維腺腫の6標本、および他の型の10標本(過形成2例、腺疾患2例、線維症4例、腺腫1例、良性葉状腫瘍1例)を含んだ。悪性腫瘍は、in situ腺管癌5例、in situ小葉癌2例、浸潤性腺管癌13例、浸潤性小葉癌2例、管状癌3例、および粘液性癌1例を含んだ。

正常乳房組織の10例すべてが膜CA IXについて陰性であり、授乳中乳房の標本1例で弱い細胞質染色のまばらな細胞が少数しか認められなかった。良性病変では、弱から強までの



範囲の陽性膜シグナルが36標本のうち4(11%)に検出された。すべての陽性病変は線維嚢胞性変化に分類された。陰性標本の中でも、線維腺腫1例と線維嚢胞性変化を有する病変3例が少数の上皮細胞で弱い細胞質染色を示した一方、他の良性病変は全く染色されなかった。

#### 【0248】

線維嚢胞性変化を有する切片では、染色シグナルは主に異常な上皮に局限され、大部分がアポクリン化生の範囲であった(たとえば、アポクリン化生上皮に見られた弱い散在性細胞質染色)。散在性細胞質パターンの弱いシグナルが3標本で観察された。4例の中陽性から強陽性の標本が限局性膜染色を示した。(たとえば、良性過形成上皮に見られた上皮細胞の強い限局性膜染色)。線維嚢胞性変化および硬化性腺症を有する1例では、強いCA IX-特異的染色が上皮下線維芽細胞および内皮に検出された。

#### 【表8】

表8  
正常、良性、および悪性乳房組織におけるCA IXの免疫組織化学染色の要約

組織の型	総数	陽性標本*		発現レベル	
		数	%	平均	範囲
正常乳房	10	1	10	0.10	0-1
良性病変	36	4	11	0.39	0-3
線維腺腫	6	0	0	0.17	0-1
線維嚢胞性変化	20	4	20	0.65	0-3
その他の型	10	0	0	0.00	
悪性腫瘍	26	12	46	1.42	0-3
In situ	7	4	57	1.28	1-2
浸潤性	19	8	42	1.47	0-3

\*陽性は膜染色を有する標本のみに割り当てた。

#### 【0249】

26例の悪性乳房組織標本のうち、CA IXタンパク質の細胞膜発現は12例の癌で検出可能であった(46%)(表8)。陽性は主に異常な上皮で観察された。弱く染色された標本の大部分が限局性細胞質パターンを示した一方、中等度から強い染色は主に限局性膜型であった。興味深いことに、強陽性悪性の6例のうち浸潤性腺管癌の4例で、染色が間質性線維芽細胞に、および時々内皮細胞にも観察された。実際、強陽性の間質および陰性癌細胞を有する標本2例があった(たとえば、腫瘍標本中で、強い特異的陽性が間質性線維芽細胞および内皮細胞に存在したが、浸潤性腺管癌の範囲には存在しなかった)。硬化性腺症を伴うin situ腺管癌の1標本では、強陽性が腺症に見出され、一方insitu部分は陰性であった。最後の強陽性腫瘍組織標本は粘液性癌に分類され、CA IXを異常な上皮細胞の膜で限局性に発現することが見出された。一方、in situ小葉癌および2例中1例の浸潤性小葉癌は共に弱い細胞質染色だけを示したが、残りの小葉癌標本は全く陰性であった。

#### 【0250】

分析した悪性腫瘍のCA IX発現と基本的臨床病理パラメータとの比較は、年齢、リンパ腺の状態、腫瘍の大きさおよび重症度との間に何ら有意な関係を明らかにしなかった。

【表 9】

表9  
正常、良性、および悪性乳房組織における CA9 遺伝子発現の RT-PCR 分析の要約

組織の型	総数	陽性標本*		発現レベル	
		数	%	平均	範囲
正常乳房	3	0	0	0.0	
良性病変	33	11	33	0.39	0-3
線維腺腫	9	5	56	0.56	0-3
線維嚢胞性変化	20	6	30	0.40	0-1
その他の型	4	0	0	0.00	
悪性腫瘍	39	25	64	1.03	0-3
In situ	3	1	33	0.33	1-3
浸潤性	36	24	67	1.08	0-3

【0251】

## 乳房組織の RT-PCR 分析

RT-PCR 分析に使用した標本は、正常組織3例、良性病変33例、および悪性腫瘍39例を含んだ(表9)。良性組織標本は、線維嚢胞性変化を有する病変20例、線維腺腫9例、および他の型の病変4例(腺症1例、上皮症1例、管内乳頭腫1例、および非特異的自己免疫肺肺炎1例)から成った。悪性組織は、in situ 腺管癌3例、32浸潤性腺管癌32例、浸潤性小葉癌2例、管状癌1例、および粘液性癌1例を含んだ。

【0252】

正常組織標本の3例すべてがCA9転写産物について陰性であった一方、特異的RT-PCR産物が良性病変の33%で検出された。良性病変9例は弱陽性と評価され、病変の1例は中陽性を示し、良性病変の1例だけが強陽性を示した。一方、悪性腫瘍の64%がCA9を発現し、うち14例の組織が弱陽性であり、9例が中陽性であり、3例が強陽性であった(表9)。(標準として165bpの $\alpha_2$ -ミクログロブリン関連PCR産物を用いて、255bpのCA9特異的PCR産物が検出された)。上記の通り、CA9発現と臨床病理パラメータとの間に有意な関連は何も無かった。

【0253】

## IHCとRT-PCRデータの一致

両方の方法で同時に分析された患者36名の標本から得られたIHCおよびRT-PCRデータの比較は、結果の69.4%一致を示した。IHC陰性/RT-PCR陰性が19例、IHC陽性/RT-PCR陽性が6例、IHC陰性/RT-PCR陽性患者が10例、およびIHC陽性/RT-PCR陰性が1例であった。不一致は部分的には方法論の違いから生じる可能性があり、それは少なくとも一部のRT-PCR陽性/IHC陰性データを説明した。実際、弱い細胞質染色が、IHCで陰性と評価されたがRT-PCRで陽性とされた6例の標本で観察された。加えて、乳癌の不均一性と結びつき、またその2つの方法が同一患者から得られた組織の別々の部分を用いて実施されたという事実に関係する、客観的問題が存在した。

【0254】

この問題は、乳房標本の第一の部分には存在するが第二の部分には欠けている、小さい範囲の限局性CA IX発現を有する例で特に重要であろう。この仮説を支持するのは、5例の対になった標本で組織学的評価が異なったことで、それらの標本では過形成のような重症度の低い形態的变化を含む組織の部分でCA IX陰性が観察された一方、陽性がinsitu癌のようなより顕著な異常の存在を伴った。

## 【0255】

## CA9の乳癌マーカーとの関係

CA9遺伝子発現の分子的背景を理解し、その乳癌における意義の可能性についてより多くを知るために、我々は4種類の別のマーカーの同時半定量RT-PCR分析を実施した。それらは下記をコードする遺伝子を含んだ：(1)エストロゲン受容体(ER)、内分泌治療への反応の既知の予測因子；(2)1型受容体チロシンキナーゼc-erbB2(HER-2/neu)、内分泌反応の欠如、悪性表現型、予後不良に関連する；(3)c-erbB3、触媒的に不活性なりガンド結合c-erbB2ホモログ、ER陽性腫瘍における内分泌反応の良好な予測因子として提案されている；および(4)接着分子CD44、転移能の有望な指標 (Osborne et al. (1996); Revillion et al. (1998); Knowiden et al. (1998); Kaufmann et al. (1995))。

10

統計分析のために、39例の悪性標本を2群に分けた。CA9陰性群はCA9の発現が内部標準の10%未満である14標本を含み、CA9陽性群はCA9mRNAを10%を超える任意のレベルで発現している25標本から成った。両方の群で、標本は4種類のマーカーそれぞれの発現について陽性または陰性に分類された。内部標準の10%のカットオフ値をER、c-erbB3、およびCD44に用いた。内部標準の100%のカットオフ値は、c-erbB2陽性良性病変における平均発現レベルの2倍に相当する値として、c-erbB2の過剰発現について推定された。この判定基準を用いて、我々の集めた悪性乳房組織の25.6%がc-erbB2を過剰発現することが見出され、文献からのデータと合致した (Revillion(1998))。CA9と各マーカーとの間の関連はカイ二乗検定(またはc-erbB2の場合はフィッシャーの正確確率検定)によって検定し、陰性/陽性評価における一致を計算した(図7A)。

20

## 【0256】

悪性乳房組織におけるCA9の発現は、ER( $p=0.86$ )、c-erbB3( $p=0.35$ )、およびCD44( $p=0.15$ )とは有意な関連を示さなかったが、CA9とc-erbB2との間には正の関連が存在した( $p=0.05$ )。CA9mRNAについて陽性の標本25例のうち9例(36%)がc-erbB2を過剰発現した一方、CA9陰性組織14例のうち1例(7%)だけがc-erbB2過剰発現について陽性に分類された。

## 【0257】

マーカーの発現レベルがCA9陰性組織とCA9陽性組織との間で異なるかどうか調べるために、マーカー陽性標本のみを含めてMann-Whitney順位検定を実施した。CA9陰性14例の群には、8例のER-、1例のc-erbB2-、8例のerbB3-、および8例のCD44陽性標本があった。一方、25CA9陽性例には、15例のER-、9例のc-erbB2-、18例のerbB3-、および19例のCD44陽性標本があった。個々のマーカーについての発現値の分布は似た形で、CA9陽性と陰性組織の間で異なった。マーカーのうち3種類すなわちER、c-erbB2、およびc-erbB3はCA9陽性標本群でより高い発現の中央値を示したが、有意差( $p=0.02$ )はc-erbB2についてのみ見られた(図7B)。c-erbB2の発現の中央値はCA9陽性組織の群でCA9陰性群より57%高かった。この結果はCA9とc-erbB2との間の関連をさらに裏付けた。

30

## 考察

乳癌の発症は多数の分子的变化の蓄積によって推進される。この過程は線形回帰モデルに従わないが、高度に複雑で可塑性である (Bergstein, 1. (1999))。その理解および関係する構成成分の特定は、治療目的での患者のよりよい階層化のためだけでなく、異常な細胞経路を標的としたより効果的な治療戦略の開発を可能にするためにも必須である。

40

## 【0258】

実施例11に記載の、細胞表面炭酸脱水酵素IXの異所性活性化は、乳癌発生に寄与する分子的变化のうちの一つであるように見える。そのmRNAもタンパク質も正常乳房組織には見出されなかった。

## 【0259】

CA IX発現は、2連の部分的に独立した標本について実施したIHCおよびRT-PCR分析の両方によって記録された通り、良性病変の相対的に低い割合に観察された一方、悪性腫瘍におけるCA IXの頻度は顕著により高かった。同様の筋書きが、悪性組織における相対的に早い出現およびCA IX発現の増加に関して、子宮頸部、食道、および結腸に由来する他の型の癌で以前に観察されている (Liao et al (1994)、Turner et al. (1997)、Saarn

50

io et al. (1998) )。一方、新生物発生前疾患における発現の欠如、および発現と悪性変換との関連が、腎細胞癌および肺癌で実証された (McKiernan et al.(1997)、 Vermylen et al. (1999)、 Liao et al.(1997) )。異なる組織での異なる活性化のタイミングの理由は不明であるが、しかしそれはさまざまな型の腫瘍の発生に關与する調節経路と関係している可能性がある。たとえば、腎細胞癌におけるCA IXの高く均一な発現は、フォンヒッペルリンドウ腫瘍抑制因子タンパク質の活性化と結びつき、CA IXに対するその負の調節の消失に繋がるように見える (Ivanov et al. (1998) )。

この免疫組織化学分析は、CA IX陽性乳房病変の大多数が、異常な上皮細胞に染色シグナルを含んだことを明らかにした。発現パターンは非常に可变的であり、乳癌細胞の不均一性を反映している可能性が非常に高い: 当該タンパク質細胞膜および/または細胞質に局在化しており、染色範囲は限局性から散在性までさまざまであった。特筆すべきことに、間質性細胞にも強い特異的陽性が検出された2例、および間質に強い染色が存在したが癌の範囲には存在しなかった2例があった。CA IXのそのような分布は悪性直腸結腸腫瘍で以前に観察されており、そこでは線維形成性結合組織が時々突出した免疫染色を示した (Saarnio et al. (1998) )。これらの奇妙な知見は説明が困難であるが、しかしCA IX発現に影響を及ぼす微小環境因子の存在を示唆する。上皮と隣接する間質との間の相互干渉が、新生物性形質転換の過程を調節するのに重要な役割を果たすことはよく知られている (Heber et al (1996)、 Golddyne et al. (1991) )。間質におけるCA IXの活性化は、したがって異常な上皮細胞と周囲の線維芽細胞との間の異常な傍分泌情報伝達の結果を表す可能性がある。あるいは、腫瘍間質におけるCA IX発現は、哺乳類癌の間質性細胞において最近観察された遺伝子異常と関係している可能性がある (Moinfar et al. (2000) )。

CA IXの発現パターンもまた微小環境ストレスによって影響されている可能性があり、腫瘍表現型の発生への微小環境ストレスの重大な寄与はますます認められた現象となっている (Blancher and Harris (1998) )。実際に、Wykoff et al. 2000は低酸素性ストレスとCA IXの誘導との間に密接な関連を近年実証した。彼らは、CA IXのアップレギュレーションは低酸素性反応の重要な媒介因子であるHIF-1転写複合体を介した転写活性化の段階で起こることを示しており、彼らはCA IXが腫瘍低酸素についての有用なマーカーである可能性があると提示している。

#### 【 0 2 6 0 】

低酸素は腫瘍進行の主要な原動力の一つである (Blancher and Harris (1998) )。それは好氣的解糖を含む腫瘍代謝経路の発生および血管新生に關与する遺伝子の活性化に繋がる。CA IXは、細胞外酸性化を介した低酸素誘導性発癌代謝、および正常細胞内pHの維持に關与しそれによって腫瘍細胞の伝播および生存に必要な条件に寄与するように見える (Wykoff et al. (2000) )。臨床的視点からは、低酸素は予後不良、悪性表現型、および抗癌治療に対する抵抗性と関連している (Blancher and Harris (1998) )。このことは、我々が見出したCA IXの異所性発現と予後の悪い活動的な乳癌のマーカーの役割を果たす受容体チロシンキナーゼをコードする癌遺伝子であるc-erbB2の過剰発現との間の関連を説明できる (Revillion et al. (1998) )。

#### 【 0 2 6 1 】

活性化された癌遺伝子によって媒介されるシグナル 伝達は、腫瘍代謝表現型の発現を低酸素とは独立に誘導する可能性があり、または低酸素性 反応を増幅する可能性がある (Blancher and Harris(1998) )。c-erbB2の不活性化は重要な低酸素性 標的である血管内皮増殖因子の発現低下を伴うことが示された (Petit et al.(1997) )。類推によって、この観察はc-erbB2とCA IXとの間の機能的関連の手掛かりを与えるであろう。c-erbB2高発現を伴う一部の性質、たとえば浸潤および転移能は、CA IXの同時発現によっても媒介される可能性がある。実際、c-erbB2陽性癌のかなりの割合が、c-erbB2に対するヒト化モノクローナル抗体であるハーセプチンによる治療に反応しない (Kuter I.(2001) )。したがって、随伴するCA IXの発現の阻害剤はさらに治療的価値を有することが考えられる。この仮定は、CA活性の阻害が一部の腫瘍細胞株の浸潤を抑える (Parkkila et al. (2000) )、またCA阻害剤による治療が癌化学療法への付加として有益であろう (Teicher et al

．(1993) ) という証拠によって支持される。

結論として、この実施例は、CA9遺伝子の発現が、頻度および／または発現パターンの両方に関して、一部の他の型の癌と同様な方法で乳癌と関連していることを示している。ここに示すデータは、特に乳癌におけるCA9の予後診断的／予知的価値の可能性、およびCA9のc-erbB2との関係の意義を対象としたさらなる大規模分析の必要性を強調する。総体的に、我々の研究はCA9活性化は発癌の一般的現象であって新規の治療標的であるという見解を裏付ける証拠の蓄積に追加する。

【 0 2 6 2 】

#### 実施例 1 2

##### 腫瘍 細胞および胃で発現されたMNタンパク質のin vivoの到達性

10

ラットMNタンパク質を発現しているBP6皮下腫瘍(直径約1cm)を有するLewisラット(384g)に $^{125}\text{I}$ -M75Mab( $2.5 \times 10^6$ cpm)を腹腔内(i.p.)注射した。5日後、その腫瘍および組織の0.5～1gの断片を秤量し、放射能を カウンターで測定した

表10は結果を要約する。最高の放射能は腫瘍中に存在した。総体的に高い放射能が肝臓および腎臓に見出され、明らかに血液からのマウスIgGのクリアランスを反映した。胃は相対的に低いレベルの放射能に留まり、胃 粘膜で露出したMN タンパク質へのM75 Mabの接近が制限されていることを示した。

【表 1 0】

表 1 0  
ラット器官および腫瘍における $^{125}\text{I}$ -M75 の放射能の分布

20

器官	cpm/g				
腎臓	2153	2184			
脾臓	653	555			
肝臓	1993	1880			
肺	1183	1025			
血液	1449				
心臓	568	477			
胃	1184	1170			
精巣	812	779			
尾	647				
腫瘍	3646	4058	3333	8653	3839

30

【 0 2 6 3 】

#### ブダペスト条約寄託

下記に列挙した材料は、American Type Culture Collection (ATCC)、現所在 10810 University Blvd., Manassus, Virginia 20110- 2209 (米国)に寄託された。寄託は「特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約(「ブダペスト条約」)」の条項に基づいて行った。生存培養の維持は寄託の日から30年間保証されている。ハイブリドーマおよびプラスミドはブダペスト条約の条項に従ってATCCによって利用可能になり、寄託されたハイブリドーマおよび プラスミドの一般への制限無しの分譲を本出願の特許付与時から保証する、 出願人とATCCとの間の合意下に置かれる。寄託された細胞株の入手可能性は、いかなる政府の権限下でもその政府の特許法に基づいて付与される権利に抵触して本発明を実施するための許諾と解してはならない：

40

## 【表 1 1】

表1.1		
<u>ハイブリドーマ</u>	<u>寄託日</u>	<u>ATCC番号</u>
VU-M75	1992年9月17日	HB11128
MN 12.2.2	1994年6月9日	HB11647

<u>プラスミド</u>	<u>寄託日</u>	<u>ATCC番号</u>
A4a	1995年6月6日	97199
XE1	1995年6月6日	97200
XE3	1995年6月6日	97198

10

## 【0264】

同様に、V/10 モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株V/10-VUは、2003年2月19日にブダペスト条約に基づき、Universeit Gent, K. L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent, BelgiumのLaboratorium voor Moleculaire Biologie-Plasmidencollectie (LMBP)のBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) (BCCM/LMBP) の国際寄託機関(IDA)に寄託番号LMBP\_6009CBとして寄託した。

本発明の前記実施形態の詳細な説明は例証および説明の目的で示されている。それらは網羅的であることまたは本発明を開示された正確な形に制限することを意図せず、また明らかに上記の教示に照らして多くの改変および変化が可能である。それらの実施形態は、本発明の原理および実際の応用を説明し、それによって他の当業者に本発明をさまざまな実施形態で、および意図される特定用途に適したさまざまな改変を伴って使用可能にするために選択され説明された。

20

## 【0265】

ここで引用されたすべての参考文献は参照によって本開示に含まれる。

## 【参考文献】

## 【0266】

- Aboagye et al., Anticancer Drug Des., 13(6): 703-730 (Sep. 1998)
- Airley et al., Clin. Cancer Res., 7: 928-934 (2001)
- Airley et al., Brit. J. Cancer, 86 (Suppl. 1): S13-S33 (2002)
- Arteaga, C.L., Breast Cancer Res., 5(2): 96-100 (2003)
- Bartosova et al., J. Pathol., 197: 1-8 (2002)
- Beasley et al., Cancer Research, 61: 5262-5267 (2001)
- Bergstein, I., Breast Cancer: Molecular Genetics, Pathogenesis, and Therapeutics, Bowcock AM (ed.), Humana Press: Totowa, pp. 143-169 (1999) 10
- Brizel et al., Cancer Res., 56: 941-943 (1996)
- Brizel et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 38: 285-289 (1997)
- Carney et al., U.S. Patent No. 5,401,638
- Chapman, J.D., Radiother. Oncol., 20(Suppl. 1): 18-19 (1991)
- Chegwiddden et al. (eds.), "The Carbonic Anhydrase Inhibitors – New Horizons," EXS (Basel) Vol. 90 (2000) 20
- Christianson and Cox, Annu. Rev. Biochem., 68: 33-57 (1999)
- EXS (Experientia Supplementa) (Basel) Vol. 90 [Birkhauser; Boston, MA (USA): 2000]
- Chia et al., J. Clin. Oncol., 19: 3660-3668 (2001)
- Chrastina et al., Int. J. Cancer (in press) (2003)

- Clark M., Immunol. Today, 21(8): 397-402 (Aug. 2000)
- Dachs et al., Nature Medicine, 3: 515-520 (1997)
- Dalbadie-McFarland et al., PNAS (USA), 79: 6409 (1982)
- Davis et al., Cancer Metastasis Rev., 18(4): 421-425 (1999)
- Ebert et al., J. Biol. Chem., 270(49): 29083-29089 (1995)
- Evans et al., Cancer Res., 56: 405-411 (1996)
- Ey et al., Biochemistry, 15: 429-436 (1978) 10
- Fleming et al., J. Clin. Invest., 96: 2907-2913 (1995)
- Forsythe et al., Mol. Cell. Biol., 16: 4604-4613 (1996)
- Fyles et al., Radiother. Oncol., 45: 149-156 (1998)
- Gavilondo and Larrick, Biotechniques, 29(1): 128-132, 134-136 and 183 passim (July 2000)
- Gibadulinova et al., Acta Virol., 42: 369-374 (1999)
- Giatromanolaki et al., Cancer Res., 61(21): 7992-7998 (2001) 20
- Glennie et al., Nature, 295: 712 (1982)
- Goldyne et al., Adv. Exp. Med. Biol. 314: 317-327 (1991)
- Gray et al., Br. J. Radiol., 26: 638-648 (1953)
- Gumbiner, B., Cell, 84: 345-357 (1996)
- Gura, T., Nature, 417(6889): 584-586 (June 6, 2002)
- Jain and Baxter, Cancer Res., 48: 7022-7032 (1988)
- Jain et al., Nature Med., 6(2): 131-132 (2000)
- Hall, E.J., Radiobiology for the Radiologist, 5<sup>th</sup> ed., Philadelphia (PA): Lippincott (1998) 30
- Harris, A.L., Nature Reviews Cancer, 2: 38-47 (2002)
- Heber et al., Adv. Exp. Med. Biol., 399: 41-51 (1996)
- Hockel and Vaupel, Journal of National Cancer Institute, 93(4): 266-276 (Feb. 21, 2001)
- Hockel and Vaupel., CME J. Gyn. Oncol., 6/2: 216-225 (2001)
- Hockel and Vaupel, Seminars in Oncol., 28 (Supp.. 2): 36-41 (April 2001) 40
- Hockel et al., Radiother. Oncol., 26: 45-50 (1993)
- Hocker et al., Am. J. Physiol., 270: G619-G633 (1996)
- Hodgkiss et al., Adv. Exp. Med. Biol., 428: 61-67 (1997)



- Holliger and Bohlen, Cancer Metastasis Rev., 18(4): 411-419 (1999)
- Hoogenboom and Chames, Immunol. Today, 21(8): 371-378 (Aug. 2000)
- Hui et al., Clinical Cancer Research, 8: 2595-2604 (2002)
- Hunter, W.M., "Radioimmunoassay," In: Handbook of Experimental Immunology, pp. 14.1-14.40 (D.W. Weir ed.; Blackwell, Oxford/London/Edinburgh/Melbourne; 1978)
- Ishikawa et al., J. Exp. Med., 186: 999-1014 (1997) 10
- Ivanov et al., PNAS (USA), 95: 12596-12601 (1998)
- Ivanov et al., American Journal of Pathology, 158: 905-919 (2001)
- Kaestner et al., Genes Dev., 11: 1583-1595 (1997)
- Kallinowski et al., Int. J. Radiat Oncol. Biol. Phys., 19: 953-961 (1990)
- Kaluz et al., Journal of Biological Chemistry, 274: 32588-32595 (1999)
- Kaluz et al., Cancer Research, 62: 4469-4477 (2002)
- Karam et al., Am. J. Physiol., 272: G1209-1220 (1997) 20
- Kaufmann et al., Lancet, 345: 615-619 (1995)
- Kennedy et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 37: 897-905 (1997)
- Knowlden et al., Oncogene, 17: 1949-1957 (1998)
- Koch et al., Br. J. Cancer, 72: 869-874 (1995)
- Korinek et al., Nature Genetics, 19: 379-383 (1998)
- Koukarakis et al., Clin. Cancer Res. 7(11): 3399-3403 (2001)
- Kuter, I., The Oncologist, 6: 338-346 (2001) 30
- Lane et al., Meth. Enzymol., 121: 183-192 (1986)
- Laughner et al., Mol. Cell Biol., 21: 3995 (2001)
- Lee et al., J. Clin. Invest., 106: 1447-1445 (2000)
- Lefebvre et al., Science, 274: 259-262 (1996)
- Lewis et al., PNAS (USA) 85: 1962-1966 (1988)
- Li et al., Mol Cell Biol., 20: 697-701 (2000)
- Liao and Stanbridge, Cancer Epidemiol. Biomar. Prev., 5: 549-557 (1996) 40
- Liao and Stanbridge, Cancer, 88: 1108-1121 (2000)
- Liao et al., Am. J. Pathol., 145: 598-609 (1994)
- Liao et al., Cancer Res., 57: 2827-2831 (1997)
- Lieskovska et al., Neoplasma, 46: 17-24 (1999)

- Lindmo et al., J. Immunol. Methods, 72: 77-89 (1984)
- Loncaster et al., Cancer Res., 61: 6394-6399 (2001)
- Mandriota et al., Cancer Cell, 1: 459-468 (2002)
- Marks et al., BioTechnology, 10: 779 (1992)
- Maren, T.H., J. Glaucoma, 4(1): 49-62 (1995)
- Maxwell et al., PNAS (USA), 90: 2423-2427 (1993)
- McKiernan et al., Cancer Res., 57: 2362-2365 (1997) 10
- McKiernan et al., Cancer, 86: 492-497 (1999)
- Murakami et al., BJU Int., 83: 743-747 (1999)
- Moinfar et al., Cancer Res., 60: 2562-2566 (2000)
- Nordsmark et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 49(2): 581-586 (2001)
- Nordsmark et al., Radiother. Oncol., 41: 31-39 (1996)
- Olive et al., Cancer Research, 61: 8924-8929 (2001)
- Opavsky et al., Genomics, 33: 480-487 (1996) 20
- Ortova-Gut et al., Gastroenterology, 123: 1889-1903 (2002)
- Osborne et al., Science Med: 32-41 (1996)
- Owens and Young, J. Immunol. Methods, 168(2): 149-165 (Feb. 10, 1994)
- Parkkila and Parkkila, Scand. J. Gastroenterol., 31: 305-317 (1996)
- Parkkila et al., PNAS (USA), 97: 2220-2224 (2000)
- Pastorek et al., Oncogene, 9: 2877-2888 (1994)
- Pastorekova et al., Virology, 187: 620-626 (1992) 30
- Pastorekova et al., Gastroenterology, 112: 398-408 (1997)
- Peles et al., Cell, 82: 251-260 (1995)
- Petit et al., Am. J. Pathol., 151: 1523-1530 (1997)
- Powell et al., Radiother. Oncol. 50(2): 167-171 (Feb 1999)
- Raleigh et al., Cancer Res., 58(17): 3765-3768 (Sep. 1, 1998)
- Ramalho-Santos et al., Development, 127: 2763-2772 (2000)
- Revillion et al., Euro J. Cancer, 34: 791-808 (1998)
- Saarnio et al., Gut, 41(3): 186 (1997) 40
- Saarnio et al., Am. J. Pathol., 153: 279-285 (1998)
- Saarnio et al., J. Histochem Cytochem, 46: 497-504 (1998)
- Saarnio et al., J. Histochem. Cytochem., 47: 517-524 (1999)

- Saarnio et al., Journal of Hepatology, 35: 643-649 (2001)
- Sandhu, J.S., Crit. Rev. Biotechnol., 12(5-6): 437-462 (1992)
- Scarff et al., Gastronenterology, 117: 605-618 (1999)
- Seibert and Chenchik, Nucleic Acids Res., 21: 2019-2020 (1993)
- Sharp et al., Development, 121: 149-151 (1995)
- Spicer et al., J. Biol. Chem., 275: 21555-21565 (2000)
- Stratford and Workman, Anti Cancer Drug Design, 13: 519-528 (1998) 10
- Sundfor et al., Br. J. Cancer, 78: 88822-88827 (1998)
- Sundfor et al., Radiother. Oncol., 54: 101-107 (2000)
- Supuran and Scozzafava, Expert Opin. Ther. Patents, 12(2): 217-242 (2002)
- Supuran et al., Bioorg. Med. Chem., 9: 703-714 (2001)
- Swinson et al., Br. J. Cancer, 86 (Supp. 1): S13 (2002)
- Swinson et al., J. Clin. Oncol., 21(3): 473-482 (Feb. 1, 2003)
- Teicher et al., Anticancer Res., 13(5A): 1549-1556 (1993) 20
- Trikha et al., Current Opinion in Biotechnology, 13(6): 609-614 (2002)
- Turner et al., Hum. Pathol., 28: 740-744 (1997)
- Turner et al., Brit. J. Cancer, 86: 1276-1282 (2002)
- Uemura et al., B. J. Cancer, 81: 741-746 (1999)
- Varia et al., Gynecol. Oncol., 71: 270-277 (1998)
- Vaughan et al., Nat. Biotechnol., 16(6): 535-539 (June 1998)
- Vaupel and Hoeckel, Intl. J. Oncol., 17(5): 869-879 (Nov. 2000) 30
- Vaupel and Hoeckel, Adv. Exp. Med. Biol., 471: 533-539 (2000)
- Vermynen et al., Eur. Resp. J., 14: 806-811 (1999)
- Von Mehren et al., Annu. Rev. Med., 54: 343-369 (2003)
- Wiesener et al., Blood, 92: 2260-2268 (1998)
- Wingo et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 288: 666-669 (2001)
- World Health Organization. Histological typing of breast tumours. 2<sup>nd</sup> ed. In: International Histological Classification of Tumours, Geneva: World Health Organization, 1981 40
- Wright, N.A., Int. J. Exp. Pathol., 81: 117-143 (2000)
- Wykoff et al., Cancer Res., 60: 7075-7083 (2000)
- Wykoff et al., Am. J. Pathol., 158(3): 1011-1019 (March 2001)

- Young et al., PNAS (USA), **85**: 9533-9537 (1988)
- Zavada et al., Int. J. Cancer, **54**: 268-274 (1993)
- Zavada et al., Brit. J. Cancer, **82**: 1808-1813 (2000)
- Zou and Rajewsky, Science, **262**(5137): 1271-1274 (Nov. 19, 1993)

【図面の簡単な説明】

【 0 2 6 7 】

【図 1】図1A～Cはここに記載の通り単離されたMNcDNA（配列番号1）クローンのヌクレオチド配列を示す。図1A～CはまたcDNAによってコードされた予測アミノ酸配列（配列番号2）を示す。

10

【図 2】図2A～FはMNの10,898bpの完全なゲノム配列を示す（配列番号3）。塩基数は下記の通りである：A2654個；C2739個；G2645個；およびT2859個。11個のエキソンは一般に大文字で示してあるが、エキソン1はRNase保護分析での測定によると3507位で開始すると考えられる。

【図 3】図3はヒトMN/CA IX遺伝子のエキソン-イントロンマップを示す。エキソン(番号を付した斜線囲み)の位置および大きさ、Alu反復配列(白囲み)、およびLTR関連配列(最初の番号無しの点描囲み)は表示のスケールに調整されている。個々のMN/CA IXタンパク質ドメインに対応するエキソンは、PG(プロテオグリカン様ドメイン)、CA(炭酸脱水酵素ドメイン)、TM(膜貫通アンカー)、およびIC(細胞質内の尾部)と表示した破線枠で囲んである。マップの下で、アミノ酸配列の整列は、MN/CA IXタンパク質PG領域(aa53～111)（配列番号8）とヒトアグリカン(aa781～839)（配列番号10）との間のホモロジーの程度を示す

20

【図 4】図4はMNタンパク質構造を図式的に示す。略号は図3で用いられたのと同様である。スケールはアミノ酸の数を示す。

【図 5】図5(A)は、対応するcDNAから推論したヒトCA IX(HCA IX)およびマウスCA IX(MCA IX)タンパク質のアミノ酸配列の整列を示す（Pastorek et al. (1994)、EMBL登録番号X66839; Ortova Gut et al. (2002)、EMBL登録番号AJ245857）。相同アミノ酸は灰色の背景上に記す。図5(B)はここに記載の通り免疫法および/または免疫検出の目的に用いられたCA IX変異体の略図である。CA IXドメイン構成および変異体に関係する領域に関連するアミノ酸の位置を下記に示す。抗体(Y)に対する抗原性部位の配置は、競合分析から推定して、図の上に示す。ヒトとマウスCA IXタンパク質の間のアミノ酸ホモロジーのパーセンテージは、シグナルペプチド(SP)、プロテオグリカン様領域(PG)、炭酸脱水酵素ドメイン(CA)、膜貫通アンカー(TM)および細胞質内尾部(IC)から構成される完全長ヒトCA IXタンパク質の直線モデルの中に記載されている。

30

【図 6】図6は、競合結合ELISAに基づき描写した抗原性部位の交差マップを提供する。抗原被覆プレートを定量のビオチン標識抗体および増加する量の非標識競合抗体と共にインキュベートした。結果は競合抗体の非存在下での吸収に対するパーセンテージとして表す。

40

【図 7】図7は、カイ二乗検定およびMann-Whitney検定で評価した、乳癌標本中におけるCA9と他の乳癌マーカーとの関連性を示す。図7(A)は、CA9陰性標本の部分集合中のマーカー陽性乳癌のパーセンテージに対する、CA9陽性標本の部分集合中のマーカー陽性乳癌のパーセンテージを図示する。CA9の発現と個別のマーカーとの間の関連性の有意性が、適当な列に示されている。一致データは、CA9と特定の他のマーカーとの両方について等しい陽性/陰性を示す標本のパーセンテージに相当する。図7(B)は、CA9陽性およびCA9陰性部分集合に由来するマーカー陽性腫瘍でそれぞれ検出されたマーカー特異的PCR産物の発現の、5%から95%分位値の範囲および中央値を、対応する列の上に有意差の値と共に図示する。

【図 8】図8は、マウスCar9遺伝子のターゲッティング破壊のための戦略を示す。図8A--

50

ターゲッティング戦略:上、エキソン1~9を示すCar9遺伝子座のゲノム構造;中、エキソン1中の14bpを置き換えるpgk-neoカセットを有する、6.8kbのpCar9-neoターゲッティングベクター、下、相同組み換え後の遺伝子の構造。野生型対立遺伝子に存在する4.0kbのXbaI(X)および6.5kbのEcoRI(E)断片を上にし、突然変異対立遺伝子に存在する2.0kbのXbaIおよび8.3kbのEcoRI断片を下に示す。BamHI(B)、HindIII(H)についての制限部位の位置、およびEcoRIを用いた消化後に野生型と突然変異対立遺伝子とを識別するのに用いたプローブを示す。図8B--Car9ゲノム遺伝子座上のプライマーの位置を模式的に図示する。

【図9】図9は、Car9<sup>+/+</sup>対Car9<sup>-/-</sup>マウスの胃における細胞数の統計分析を提供する。Mann-Whitney順位検定によって定量された通り、突然変異マウス胃は一方で細胞総数の有意な増加を示し(A)、他方でH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase陽性旁細胞(B)およびペプシノゲン陽性主細胞(C)の数の減少を示した。回帰分析は、胃部中の細胞総数と旁細胞の数との間の有意な相関(D)、および、Car9<sup>+/+</sup>およびCar9<sup>-/-</sup>マウスの胃部にそれぞれ対応する回帰直線の傾きの間の有意差を明らかにした。

【図10】図10はCA IX抗原に対するELISAの結果を示す。HT29細胞を5cmシャーレで増殖させ、培地5mを加え、採集の2日前に培地交換した。この培養細胞単層由来の抽出物は、5mgの総タンパク質を含む。腫瘍由来の抽出物は、in vitroで予め培養することなく、切除物から直接調製した。腫瘍断片の培養に由来する培地は2日後に採取した。A=精製CA IXタンパク質 (Zavada et al, 2000に記載);B=TC培地;C=細胞および腫瘍由来の抽出物;O=精製CA IX; =A498細胞; =HT29細胞;患者番号 =38; =50; =59。

【図1A】

1 ACA GTC AGC CGC ATG GCT CCC CTG TGC CCC AGC CCC TGG CTC CCT CTG 12  
13 L I P A P A P G L T V Q L L L S 28  
49 TTG ATC CCG CCT GCT CCA GGC CTC ACT GTG CAA CTG CTG TCA 96  
29 L L L L M P V H P Q R L P R M Q 44  
97 CTG CTG CTT CTG CTT CTC CAT CCC CAG AGG TTG CCC CGG ATG CAG 144  
45 E D S P L G G G S S G E D D P L 60  
145 GAG GAT TCC CCC TTG GGA GGA GGC TCT TCT GGG GAA GAT GAC CCA CTG 192  
61 G E E D L P S E E D S P R E E D 76  
193 GGC GAG GAG GAT CTG CCC AGT GAA GAT TCA CCC AGA GAG GAG GAT 240  
77 P P G E E D L P G E E D L P G E 92  
241 CCA CCC GGA GAG GAT CTA CCT GGA GAG GAT CTA CCT GGA GAG 288  
93 E D L P E V K P K S E E E G S L 108  
289 GAG GAT CTA CCT GAA GTT AAG CCT AAA TCA GAA GAA GAG GGC TCC CTG 336  
109 K L E D L P T V E A P G D P Q E 124  
337 AAG TTA GAG GAT CTA CCT ACT GTT GAG GCT CCT GGA GAT CCT CAA GAA 384  
125 P Q N N A H R D K E G D D Q S H 140  
385 CCC CAG AAT AAT GCC CAC AGG GAC AAA GAA GGG GAT GAC CAG AGT CAT 432  
141 W R Y G G D P P W P R V S P A C 156  
433 TGG CGC TAT GGA GGC GAC CCG CCC TGG CCC CGG GTG TCC CCA GCC TGC 460  
157 A G R F Q S P V D I R P Q L A A 172  
481 GCG GGC CGC TTC CAG TCC CCG GTG GAT ATC CGC CCC CAG CTC GCC GCC 528

FIG. 1A

【図1B】

173 F C P A L R P L E L L L G F Q L P 188  
529 TTC TGC CCG GGC CTG CGC CCC CTG GAA CTC CTG GGC TTC CAG CTC CCG 576  
189 P L P E L R L R N N G H S V Q L 204  
577 CCG CTC CCA GAA CTG CGC CTG GGC AAC AAT GGC CAC AGT GTG CAA CTG 624  
205 T L P P G L E M A L G P G R E Y 220  
625 ACC CTG CCT GGT CTA GAG ATG GCT CTG GGT CCC GGG CGG GAG TAC 672  
221 R A L Q L H L H W G A A G R P G 236  
673 CGG GCT CTG CAG CTG CAT CTG CAC TGG GGG GCT GCA GGT CGT CCG GGC 720  
237 S E H T V E G H R F P A E I H V 252  
721 TCG GAG CAC ACT GTG GAA GGC CAC CGT TTC CCT GGC GAG ATC CAC GTG 768  
253 V H L S T A F A R V D E A L G R 268  
769 GTT CAG CTC AGC ACC GCC TTT GCC AGA GGT GAC GAG GCC TTG GGG CGC 816  
269 P G G L A V L A A F L E E G P E 284  
817 CCG GGA GGC CTG GGC TTG GCC TTT CTG GAG GAG GGC CCG GAA 864  
285 E N S A Y E Q L L S R L E E I A 300  
865 GAA AAC AGT GCC TAT GAG CAG TTG CTT GCT GGT GAA GAA ATC GGT 912  
301 E G S E T Q V P G L D I S A L 316  
913 GAG GAA GGC TCA GAC ACT CAG CTC CCA GGA CTG GAT ATA TCT GCA CTC 960  
317 L P S D F S R Y F Q Y E G S L T 332  
961 CTG CCC TCT GAC TTC AGC CGC TAC TTC CAA TAT GAG GGG TCT CTG ACT 1008  
333 T P P C A Q G V I W T V F N Q T 348  
1009 ACA CCG CCC TGT GCC CAG GGT GTC TGG ACT GTG TTT AAC CAG ACA 1056

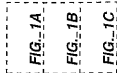
FIG. 1B

【図 1 C】

349 V M L S A K Q L H T L S D T L W 364  
1057 GTG ARG CTG AGT GCT AAG CAG CTC CAC ACC CTC TCT GAC ACC CTG TGG 1104  
365 G P G D S R L Q L N F R A T Q P 380  
1105 GGA CCT GGT GAG TCT CGG CTA CAG CTT AAC TTC CGA GCG ACG CAG CCT 1152  
381 L N G G R V I E A S F P A G V D S 396  
1153 TTG AAT GGG CGA GTG ATT GAG GCC TTC CCT GCT GGA GTG GAC AGC 1200  
397 S P R A A E P V Q L N S C L A A 412  
1201 AGT CCT CGG GCT GCT GAG CCA GTC CAG CTG AAT TCC TGC CTG GCT GCT 1248  
413 G D I C T A GGC CTG GTT TTT GGC CTC CTT TTT GCT GTC ACC AGC 1296  
1249 GTG AAT GGG CGA GTG ATT GAG GCC TTC CCT GCT GGA GTG GAC AGC 1296  
429 V A F L V Q M R R Q H R R G T K 444  
1297 GTC CGG TTC CTT GTG CAG ATG AGA AGG CAG CAC AGA AGG GGA ACC AAA 1344  
445 G G V S Y R P A E V A E T G A \* 460  
1345 GGG GGT GTG AGC TAC CGC CCA GCA GAG CTA GCC GAG ACT GGA GCC TAG 1392  
1393 AGG CTG GAT CTT GGA GAA TGT GAG AAG CCA GCC AGA GGC ATC TGA GGG 1440  
1441 GGA GCC GGT AAC TGT CCT GTC CTG CTC ATT ATG CCA CTT TTT AAC 1488  
1489 TGC CAA GAA ATT TTT TAA AAT AAA TAT TTA TAA T 1522

FIG.\_1C

FIG.\_1



【図 2 A】

1 ggaactgtgtt gactgtgtt gactgtgtt gactgtgtt gactgtgtt gactgtgtt gactgtgtt gactgtgtt gactgtgtt gactgtgtt  
61 ccaactcagg taaataggat taaggggggg cttaccccca accctgtgtt cttctgaacaa tgaagtgtgt  
121 aaggcagcat gctcgttaag gctcgttaag gctcgttaag gctcgttaag gctcgttaag gctcgttaag gctcgttaag gctcgttaag gctcgttaag  
181 aactcagcat gctcgttaag gctcgttaag gctcgttaag gctcgttaag gctcgttaag gctcgttaag gctcgttaag gctcgttaag gctcgttaag  
241 tttatctggc cttccctcca cttatctcca tgaactgtgc tgaactgtgc tgaactgtgc tgaactgtgc tgaactgtgc tgaactgtgc tgaactgtgc  
301 caccacagaa tttatcctaa aaaaataaat ttaaaaaaaa aatacaaaaa aatacaaaaa aatacaaaaa aatacaaaaa aatacaaaaa aatacaaaaa  
361 aaaaaaaa gactcaagaa tagttatga taatgaata gctatgtgta aagccaagta  
421 aatgatcata ttaaaaacca gaggccatc atcaagctc atcaagctc atcaagctc atcaagctc atcaagctc atcaagctc atcaagctc  
481 cttatcatt gctatctttt ggtatcacta gttatcacta gttatcacta gttatcacta gttatcacta gttatcacta gttatcacta gttatcacta  
541 aagttttaat gcaactgttc gactgtgttc gactgtgttc gactgtgttc gactgtgttc gactgtgttc gactgtgttc gactgtgttc gactgtgttc  
601 tttaaacttt acccttaagt cagttgtgga gttatgtgga gttatgttaca gttatgttaca gttatgttaca gttatgttaca gttatgttaca gttatgttaca  
661 tagttaatgg atgcactgtg aatctgtgta tgcactgtg tgcactgtg tgcactgtg tgcactgtg tgcactgtg tgcactgtg tgcactgtg  
721 ggttagtag atgcactgtg aatctgtgta tgcactgtg tgcactgtg tgcactgtg tgcactgtg tgcactgtg tgcactgtg tgcactgtg  
781 ttttagctgg cttatctgtt aatagtgga tttatgtgta tttatgttaca tttatgttaca tttatgttaca tttatgttaca tttatgttaca tttatgttaca  
841 ttttagctgg cttatctgtt aatagtgga tttatgtgta tttatgttaca tttatgttaca tttatgttaca tttatgttaca tttatgttaca tttatgttaca  
901 ttttagctgg cttatctgtt aatagtgga tttatgtgta tttatgttaca tttatgttaca tttatgttaca tttatgttaca tttatgttaca tttatgttaca  
961 ggaatagcag tgggtccatc tgggtccatc tgggtccatc tgggtccatc tgggtccatc tgggtccatc tgggtccatc tgggtccatc tgggtccatc  
1021 tttctgtctc agctcccca gtagctggga gtagctggga gtagctggga gtagctggga gtagctggga gtagctggga gtagctggga gtagctggga  
1081 tttttgtctc ttttgttaga gacgggggtt caccgtgta gacgggggtt caccgtgta gacgggggtt caccgtgta gacgggggtt caccgtgta  
1141 cgtactgtat gttatcactc cgtactgtat gttatcactc cgtactgtat gttatcactc cgtactgtat gttatcactc cgtactgtat gttatcactc  
1201 cgtactgtat gttatcactc cgtactgtat gttatcactc cgtactgtat gttatcactc cgtactgtat gttatcactc cgtactgtat gttatcactc  
1261 tagtgtagat tttcttttat taatgtgttg ctagcgtgta ctagcgtgta ctagcgtgta ctagcgtgta ctagcgtgta ctagcgtgta ctagcgtgta ctagcgtgta  
1321 gaaatgcat gaaatgcat gaaatgcat gaaatgcat gaaatgcat gaaatgcat gaaatgcat gaaatgcat gaaatgcat gaaatgcat  
1381 cagtgtatat ctttagcttt cactgtgttt aaaaagtctt aaaaagtctt aaaaagtctt aaaaagtctt aaaaagtctt aaaaagtctt aaaaagtctt  
1441 ctttgttttg taaccacttg atcataagtg gaaaacagtg gaaaacagtg gaaaacagtg gaaaacagtg gaaaacagtg gaaaacagtg gaaaacagtg gaaaacagtg  
1501 ctttgttttg agagggtgta ttcagatgaa ttcagatgaa ttcagatgaa ttcagatgaa ttcagatgaa ttcagatgaa ttcagatgaa ttcagatgaa ttcagatgaa  
1561 ttttgttttg atgcactgtg aatctgtgta tgcactgtg tgcactgtg tgcactgtg tgcactgtg tgcactgtg tgcactgtg tgcactgtg tgcactgtg  
1621 actatgttct ttaagcaaga tatgttaaga ttttgtgac ttttgtgac ttttgtgac ttttgtgac ttttgtgac ttttgtgac ttttgtgac  
1681 catatgttct ttaagcaaga tatgttaaga ttttgtgac ttttgtgac ttttgtgac ttttgtgac ttttgtgac ttttgtgac ttttgtgac  
1741 gtttgttttt taagctgtta taagctgtta taagctgtta taagctgtta taagctgtta taagctgtta taagctgtta taagctgtta taagctgtta  
1801 tgggaattgt taagctgtta taagctgtta taagctgtta taagctgtta taagctgtta taagctgtta taagctgtta taagctgtta taagctgtta  
1861 ggttcaaat tcaaatgttg tacaagaatt gactgtgtag gactgtgtag gactgtgtag gactgtgtag gactgtgtag gactgtgtag gactgtgtag gactgtgtag  
1921 tttccacttg taggaataaa gaagtgtgaa cttctcagtt ggtgtgtgtc cttgtgtttt

FIG.\_2A

【図 2 B】

1981 ttgcacattc cttcttacty tgttaaaaaa aagtatgatc ttgtctctgag agdtgaggca  
2041 tttctaatca agatcaataa tataatctct tcaaggatla tgtctttatt  
2101 ttatcaaaaa taatttgtct ttaacagat caataataa atcccttaaa agdtgtgag  
2161 ttgtctctgag gtagtggtct acactgttaa tccagcagat ttgggtggcc aagdtgtgag  
2221 gatcaaat ttgactctct atattatct ttaaaacaga attatctctt cttctctcaa  
2281 tatgatgata ttgacagagt ttgactctct ttaaaacaga attatctctt cttctctcaa  
2341 ttgagtggtt ttgtttttt ttgtttttt gacaggtttt ttgtctgtca  
2401 ttgagtggtt ttgtttttt ttgtttttt gacaggtttt ttgtctgtca  
2461 aaccatcatt cttcttctg ttgactgtga gctgtgacta cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg  
2521 ttgactgtat ttgtttttt ttgtttttt gacaggtttt ttgtctgtca  
2581 ttgactgtat ttgtttttt ttgtttttt gacaggtttt ttgtctgtca  
2641 ttatctaat cttcttctg ttgactgtga gctgtgacta cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg  
2701 ttatctaat cttcttctg ttgactgtga gctgtgacta cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg  
2761 ttatctaat cttcttctg ttgactgtga gctgtgacta cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg  
2821 ttatctaat cttcttctg ttgactgtga gctgtgacta cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg  
2881 ttatctaat cttcttctg ttgactgtga gctgtgacta cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg  
2941 ttatctaat cttcttctg ttgactgtga gctgtgacta cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg  
3001 ttatctaat cttcttctg ttgactgtga gctgtgacta cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg  
3061 ttatctaat cttcttctg ttgactgtga gctgtgacta cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg  
3121 ttatctaat cttcttctg ttgactgtga gctgtgacta cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg  
3181 ttatctaat cttcttctg ttgactgtga gctgtgacta cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg  
3241 ttatctaat cttcttctg ttgactgtga gctgtgacta cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg  
3301 ttatctaat cttcttctg ttgactgtga gctgtgacta cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg  
3361 ttatctaat cttcttctg ttgactgtga gctgtgacta cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg  
3421 ttatctaat cttcttctg ttgactgtga gctgtgacta cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg  
3481 ttatctaat cttcttctg ttgactgtga gctgtgacta cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg  
3541 ttatctaat cttcttctg ttgactgtga gctgtgacta cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg  
3601 ttatctaat cttcttctg ttgactgtga gctgtgacta cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg  
3661 ttatctaat cttcttctg ttgactgtga gctgtgacta cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg  
3721 ttatctaat cttcttctg ttgactgtga gctgtgacta cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg  
3781 ttatctaat cttcttctg ttgactgtga gctgtgacta cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg  
3841 ttatctaat cttcttctg ttgactgtga gctgtgacta cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg  
3901 ttatctaat cttcttctg ttgactgtga gctgtgacta cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg cagtgacatg

FIG.\_2B

【図 2 C】

3961 catcaaatc caaatcagg ttccaggag ttcatgact ccttccacata cccagcacta  
4021 ggtctgttc actcagcagg gtaggggaga cttgactccc cacaagacc cttccagg  
4081 tttccacata atctccact cccactctc gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
4141 aataaaaaa agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
4201 ttgagaaag agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
4261 aaataggttg agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
4321 gtaggttgag agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
4381 caatgagaa ttgagacta gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
4441 actcccaag agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
4501 gtaggagaa agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
4561 gtaggtgag agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
4621 gtaggtgag agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
4681 gtaggtgag agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
4741 cgtactaat ttgttattt tagtagagc ggggtttgc catgtgttc gtaggtgag  
4801 gtaggtgag agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
4861 gtaggtgag agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
4921 ttgagagctg ttgagactc gtttgttgc cccgtttca accagcttc gtaggtgag  
4981 ttgagagctg ttgagactc gtttgttgc cccgtttca accagcttc gtaggtgag  
5041 gtaggtgag agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
5101 gtaggtgag agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
5161 gtaggtgag agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
5221 gtaggtgag agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
5281 gtaggtgag agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
5341 gtaggtgag agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
5401 gtaggtgag agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
5461 gtaggtgag agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
5521 gtaggtgag agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
5581 gtaggtgag agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
5641 gtaggtgag agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
5701 gtaggtgag agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
5761 gtaggtgag agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
5821 gtaggtgag agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa  
5881 gtaggtgag agagaggtga gtaggttagaa agggacagat gtagggagaa

FIG.\_2C

【 2 D 】

5941 CGGAGGACCT GCGCGGTTG GCGCGTTTC TGGAGTacc agatcttgg caccctctac  
6001 tcccctgtt cccatccat gctctcccg gactctatcg tggagccaga gaccctctac  
6061 cagcaagtc caccagggc ctggcgaca aactattca cgaactgtt gctctattga  
6121 caccactgt gaaccaggg cggggcgcc acaagattc cgaactgtt gctctattga  
6181 tctaaagagt ggtcagagc tggggaggg tgaactgca gacacatagg aaggacatg  
6241 taagagagt ggtcagagc tggggaggg tgaactgca gacacatagg aaggacatg  
6301 aggtgtcat tgcagagaa acagagatg cagtaaadg gaattggcc tatttaggc  
6361 aggtgtcat tgcagagaa acagagatg cagtaaadg gaattggcc tatttaggc  
6421 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt  
6481 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt  
6541 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt  
6601 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt  
6661 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt  
6721 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt  
6781 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt  
6841 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt  
6901 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt  
6961 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt  
7021 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt  
7081 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt  
7141 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt  
7201 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt  
7261 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt  
7321 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt  
7381 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt  
7441 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt  
7501 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt  
7561 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt  
7621 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt  
7681 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt  
7741 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt  
7801 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt  
7861 gctagggta cctcatcat tttattatt tttattatt tttattatt tttattatt

FIG.\_2D

【 2 E 】

7921 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
7981 aaaaaaac accaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
8041 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
8101 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
8161 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
8221 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
8281 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
8341 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
8401 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
8461 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
8521 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
8581 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
8641 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
8701 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
8761 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
8821 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
8881 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
8941 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
9001 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
9061 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
9121 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
9181 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
9241 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
9301 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
9361 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
9421 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
9481 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
9541 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
9601 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
9661 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
9721 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
9781 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa  
9841 gactctgtc tcaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaa gaaaccaa aatgagacaa

FIG.\_2E

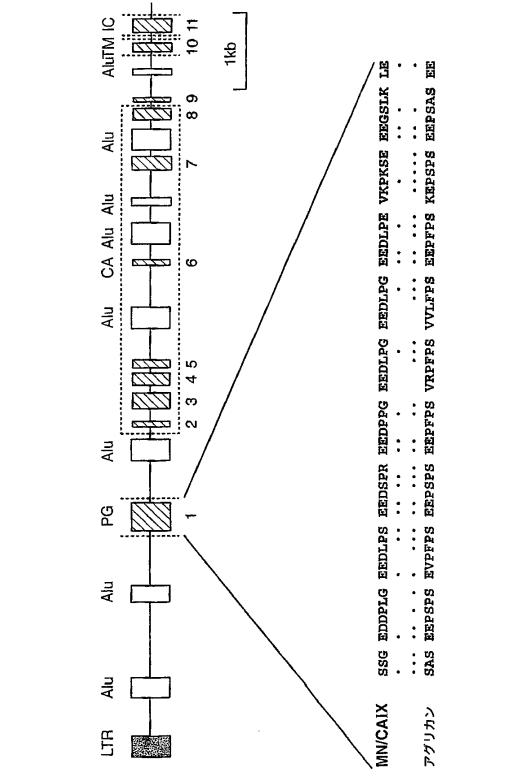
【 2 F 】

9901 gctaatgat tagaatgag attgagaat ctccagcat cctctctga aaagaatccc  
9961 cccctcttt tttaagata ggtctccat ctgttgcgc cagctgggg ttgtgggca  
10021 gctaatcag tcaactgag ctcgaactc taggtctcag caatctctc aacttattg  
10081 ctcaagcac tggagctga ggcagagcc actgtgcct gcccaaacg cccctttac  
10141 ttggtttta ggaagcaaa acgtgtcta tctaccct tctctgtat cccctctac  
10201 ccttggctg gctctctg aggtgtgag cactatggg gctctgaga actcgggca  
10261 ggggtggcg agtgcactg ggcaggtgt gaggactct gcagacctt cttctctcc  
10321 aaagcagcc tcttgcct ccatcgagc tgcagactg cccctgggt ttgcttctt  
10381 ttgtctgct accagcgtc gcttctgct gcttctgct gcttctgct ttgcttctt  
10441 ttgtctgct accagcgtc gcttctgct gcttctgct gcttctgct ttgcttctt  
10501 ttgtctgct accagcgtc gcttctgct gcttctgct gcttctgct ttgcttctt  
10561 ttgtctgct accagcgtc gcttctgct gcttctgct gcttctgct ttgcttctt  
10621 ttgtctgct accagcgtc gcttctgct gcttctgct gcttctgct ttgcttctt  
10681 ttgtctgct accagcgtc gcttctgct gcttctgct gcttctgct ttgcttctt  
10741 ttgtctgct accagcgtc gcttctgct gcttctgct gcttctgct ttgcttctt  
10801 ttgtctgct accagcgtc gcttctgct gcttctgct gcttctgct ttgcttctt  
10861 ttgtctgct accagcgtc gcttctgct gcttctgct gcttctgct ttgcttctt

FIG.\_2



【 3 】



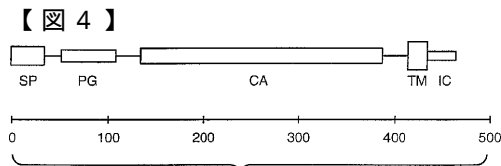


FIG. 4

【図 5 A】

	1	10	20	30	40	50	59
HCA IX	MAPLCPSPWLPLLPAPAPGLTVQLLL	SLLL	LMPVHPQRLPRMQ	EDS	PLGGGSSG	EDDP	
MCA IX	MASLGPSPWAPLSTFAP	---	TAQLLL	FLLL	QVSAQQLSGMQ	GEPS	-LGDSSSGEDP-
	61	70	80	90	100	110	
HCA IX	LGEED-	LPSEEDS	PREE-D	PPGE	EDLP	CEEDLP	GEVKKSE--EESGLKLEDLP
MCA IX	LGV-DV	LPSEEDAP	-EADPP-	-D-	GE-D-	-P-	---PEVN--SEDRMEE-SLGLLEDLS
	120	130	140	150	160	170	
HCA IX	TVFAPGDPQEP	-QNAHRD	-KEGDDQS	HMRYGGD	PMVRVS	PACAGRF	QSPVDTRPQLA-
MCA IX	TFEAP-	---	EHSQGS	-HGD	EKGGS	-S	HWSYGGTLNWPQSPACAGRFQSPVDTR--LER
	180	190	200	210	220	230	
HCA IX	-AFCPA	LPLLELL	GFQLPPL	PELRLRN	NGHS	VQLTLP	PGLKEMALGPGR
MCA IX	TAFCRT	LQPLLELL	GYELQPL	PELSLSN	NGHTVQL	TLPGL	KMALGPQGEYRALQLHLHWG
	240	250	260	270	280	290	
HCA IX	AAGRPG	SEHTVEGHR	FPAEIHVV	HLST	AFARVDEAL	GRPG	GLAVLAALFEEGPEENSAYE
MCA IX	TSDHPG	SEHTVNGHR	FPAEIHVV	HLST	AFSELHEAL	GRPG	GLAVLAALFQESPEENSAYE
	300	310	320	330	340	348	
HCA IX	QLLSRL	EEIA	EEGS--	ETQV	PGLD	TSAL	LLPSDFSRYFQV
MCA IX	QLLSHL	EEIS	EEGSKIE--	IPGL	DVSA	LLPSDFS	RYRYEGSLTTPPC
	360	370	380	390	400	408	
HCA IX	VMLSAK	QLHT	LSDTL	WGPDS	RLQLNF	RATQPL	NGRVTEASFPAGVDS
MCA IX	VKLSAK	QLHT	LSVSL	WGPDR	SLRLQLNF	RATQPL	NGRTLEASFPAAEDS
	420	430	440	450	459		
HCA IX	CLAAGG	ICAL	VFGILL	FAVTS	VAFVLM	RRQHR	--GTKGGVSYSR
MCA IX	CFTAGG	ILAL	VFGILL	FAVTS	VAFVLM	RRQHR	--GTKDRVSYSR

Fig. 5A

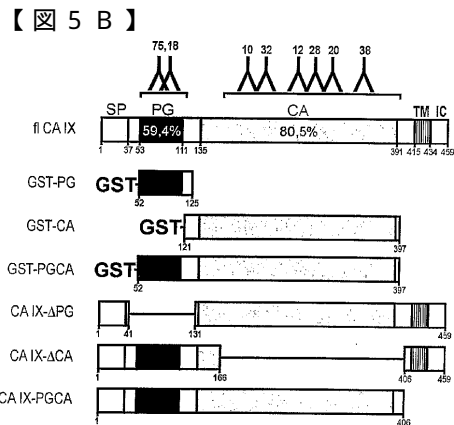
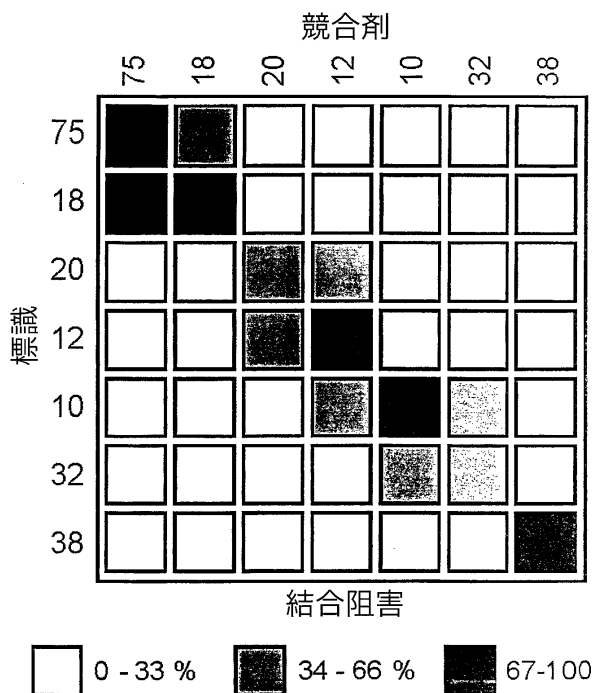
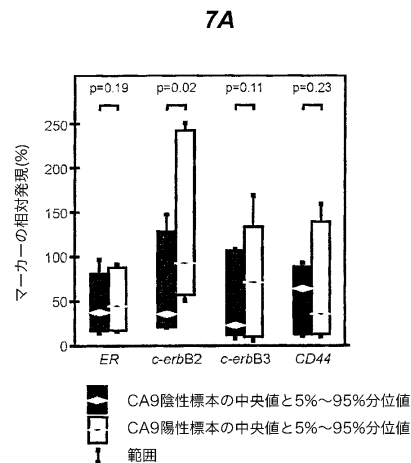
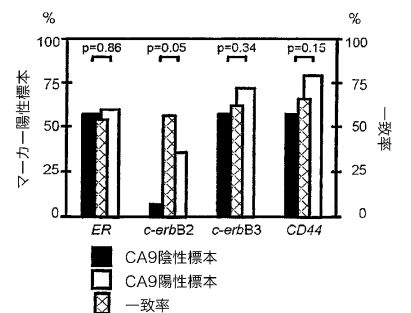


Fig. 5B

【図 6】

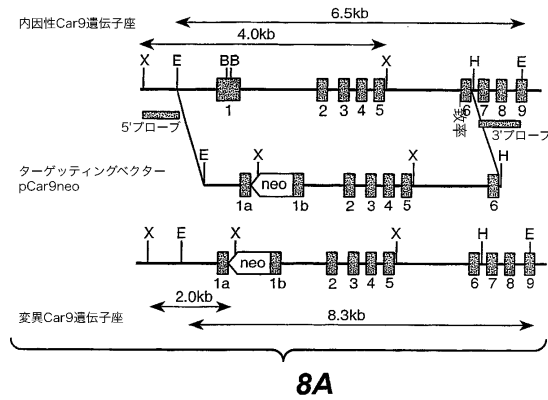


【図 7】

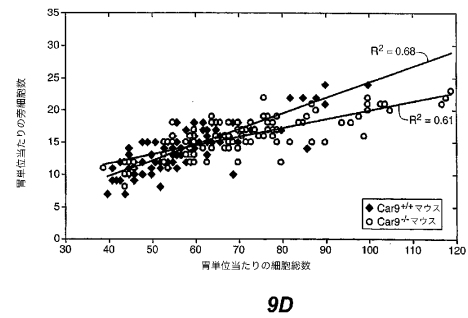
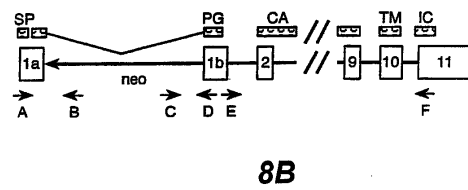
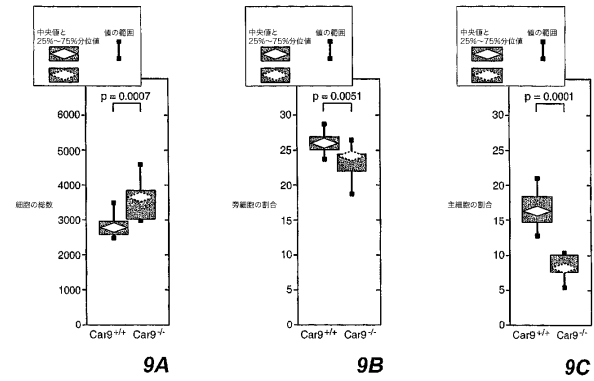




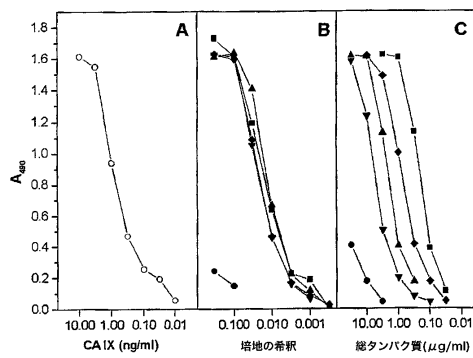
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【配列表】

0004488351000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 1 2 P 21/08	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/574 (2006.01)		G 0 1 N 33/574	A
G 0 1 N 33/577 (2006.01)		G 0 1 N 33/577	B

(31)優先権主張番号 60/358,824

(32)優先日 平成14年2月21日(2002.2.21)

(33)優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ATCC HB11128

微生物の受託番号 LMBP 6009CB

## 前置審査

(72)発明者 パストレック, ヤロミール  
スロヴァキア共和国 8 4 1 0 7 ブラティスラーヴァ ノヴォヴェスカ 1 8

(72)発明者 パストレコヴァ, シルヴィア  
スロヴァキア共和国 8 4 1 0 7 ブラティスラーヴァ ノヴォヴェスカ 1 8

(72)発明者 ザトヴィコヴァ, ミリアム  
スロヴァキア共和国 8 1 1 0 2 ブラティスラーヴァ マルティネンゴヴァ 2 2

(72)発明者 ザヴァダ, ヤン  
チェコ共和国 1 6 2 0 0 プラーク ナ ペクネ ヴィエリドツェ 1

(72)発明者 オルトヴァ グト, マルタ  
チェコ共和国 1 1 0 0 1 プラーク オパトヴィツカ 2 2

(72)発明者 ザヴァドヴァ, ズザンナ  
チェコ共和国 1 6 2 0 0 プラーク ナ ペクネ ヴィエリドツェ 1

審査官 清水 晋治

(56)参考文献 米国特許第06297041(US, B1)  
Oncologist. 2001, Vol.6, No.4, p.315-316  
Journal of immunological methods. 1999, Vol.228, No.1-2, p.109-119  
仲川嘉紀 他, 泌尿器科腫瘍学における分子研究の展望: 腎細胞癌の発癌・転移とMN/C A 9, 泌尿器科紀要, 2001年11月30日, p.809-814  
植村天受 他, 腎細胞癌標的抗原MN/C A IXの臨床的意義, 泌尿器科紀要, 2000年10月31日, p.745-748  
British journal of cancer. 2000, Vol.82, No.11, p.1808-1813  
免疫学イラストレイテッド(原書第5版), 南江堂, 2000年2月10日, p.187-188  
Transfusion clinique et biologique. 2002 Jan, Vol.9, No.1, p.15-22

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 14/00-19/00

C12N 15/00-15/90

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

- (54) 【発明の名称】可溶型の炭酸脱水酵素IX ( s - C A I X )、s - C A I Xを検出するためのアッセイ、C A I XとH E R - 2 / n e u / c - e r b B - 2の同時発現、非免疫優性エピトープに対するC A I X特異的モノクローナル抗体