

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6430373号
(P6430373)

(45) 発行日 平成30年11月28日(2018.11.28)

(24) 登録日 平成30年11月9日(2018.11.9)

| (51) Int. Cl. | F I |
|-----------------------------|----------------|
| C07K 16/18 (2006.01) | C07K 16/18 ZNA |
| C07K 7/06 (2006.01) | C07K 7/06 |
| C07K 7/08 (2006.01) | C07K 7/08 |
| C07K 7/14 (2006.01) | C07K 7/14 |
| C07K 19/00 (2006.01) | C07K 19/00 |

請求項の数 25 (全 47 頁) 最終頁に続く

| | |
|---------------|-------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2015-516391 (P2015-516391) |
| (86) (22) 出願日 | 平成25年6月11日(2013.6.11) |
| (65) 公表番号 | 特表2015-522562 (P2015-522562A) |
| (43) 公表日 | 平成27年8月6日(2015.8.6) |
| (86) 国際出願番号 | PCT/CA2013/000569 |
| (87) 国際公開番号 | W02013/185215 |
| (87) 国際公開日 | 平成25年12月19日(2013.12.19) |
| 審査請求日 | 平成28年6月9日(2016.6.9) |
| (31) 優先権主張番号 | 61/658,569 |
| (32) 優先日 | 平成24年6月12日(2012.6.12) |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) |
| (31) 優先権主張番号 | 61/809,604 |
| (32) 優先日 | 平成25年4月8日(2013.4.8) |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) |

| | |
|-----------|---|
| (73) 特許権者 | 514316411 プロミス、ニューロサイエンシズ、インコーポレイテッド PROMIS NEUROSCIENCE S INC. カナダ国オンタリオ州、トロント、ヤング、ストリート、1920、スイート、200 |
|-----------|---|

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ミスフォールドプリオンタンパク質を標的とする抗体および複合体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ミスフォールドヒトプリオンタンパク質 (PrP) エピトープ MDEYSNQNN と結合する単離された抗体であって、重鎖と軽鎖を含んでなり、各鎖は定常領域と可変領域を有し、各可変領域はフレームワーク領域と相補性決定領域 (CDR) を含んでなり、前記 CDR は下記に示されるアミノ酸配列を含んでなる抗体：

重鎖としては：

CDR 1 TYAMG (配列番号 1)
 CDR 2 VITKSGNTYYASWAKG (配列番号 2)
 CDR 3 YGIGVSYDYDI (配列番号 3)

軽鎖としては：

CDR 1 QSSQSLYNKNWLS (配列番号 4)
 CDR 2 KASTLES (配列番号 5)
 CDR 3 QGEFSCSSADCTA (配列番号 6)。

【請求項2】

前記軽鎖可変領域が配列番号 7 を含んでなる、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項3】

前記重鎖可変領域が配列番号 8 を含んでなる、請求項 1 または請求項 2 に記載の抗体。

【請求項4】

前記軽鎖が配列番号 9 を含んでなる、請求項 1 に記載の抗体。

10

20

【請求項 5】

前記重鎖が配列番号 10 含んでなる、請求項 1 または請求項 4 に記載の抗体。

【請求項 6】

エピトープ M D E Y S N Q N N、または (1) 少なくとも 5 個の連続する残基を含んでなり、かつ、(2) 請求項 1 に記載の抗体に対して結合親和性を保持するその一部に選択的に結合する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体のフラグメント。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体または請求項 6 に記載のフラグメントと、それとコンジュゲートされた毒素とを含んでなる、免疫複合体。

【請求項 8】

ウレアーゼと、それとコンジュゲートされた請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体または請求項 6 に記載のフラグメントとを含んでなる、免疫複合体。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体または請求項 6 に記載のフラグメントと、それとコンジュゲートされた検出可能な標識とを含んでなる、免疫複合体。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体、フラグメントまたは免疫複合体と薬学的に許容可能な担体とを含んでなる、医薬組成物。

【請求項 11】

ミスフォールドヒト PrP により媒介される障害の治療のための、請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

癌または C J D の治療のための、請求項 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

癌の治療のための、請求項 12 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

卵巣癌の治療のための、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

ミスフォールド PrP の検出のための、請求項 1 ~ 6 および 9 のいずれか一項に記載の抗体、フラグメントまたは免疫複合体の使用 (ただし、人体における使用を除く)。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体、フラグメントまたは免疫複合体と、ミスフォールド PrP を検出するためのその使用に関する説明書とを含んでなる、診断キット。

【請求項 17】

生体サンプルにおいてミスフォールド PrP を検出するための方法であって、前記サンプルを請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体、フラグメントまたは免疫複合体とともにインキュベートすること、および抗体結合複合体の形成を検出することを含んでなる、方法。

【請求項 18】

ミスフォールド PrP 表現型を有する罹患細胞を呈する被験体を治療するための、請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

前記罹患細胞が癌細胞である、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

前記癌細胞が白血病細胞である、請求項 19 に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

前記癌細胞が卵巣癌細胞である、請求項 19 に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

前記被験体がパクリタキセルでも治療される、請求項 21 に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

10

20

30

40

50

PrP凝集が関係する疾患を呈する被験体を治療するための医薬組成物であって、薬学的に許容可能な担体と請求項1～9のいずれか一項に記載の抗体、フラグメントまたは複合体とを含んでなる、医薬組成物。

【請求項24】

前記疾患が伝達性海綿状脳症である、請求項23に記載の医薬組成物。

【請求項25】

前記疾患がCJDである、請求項24に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

関連出願

本PCT出願は、2012年6月12日に第61/658,569号として出願された同時係属米国仮出願および2013年4月8日に第61/809,604号として出願された同時係属米国仮出願の優先権の利益を主張するものであり、これらの各出願は引用することによりその全内容が本明細書の一部とされる。

【0002】

発明の分野

本発明は、治療上および診断上の有用性を有する抗体に関する。より詳しくは、本発明は、ミスフォールド型のヒトPrPタンパク質によってユニークに提示されるエピトープに選択的に結合する抗体に関する。抗体、それらの結合フラグメントおよびそれらに基づく免疫複合体は、癌、ならびにクロイツフェルト-ヤコブ病(CJD)などの伝達性海綿状脳症を含むPrPのミスフォールディングおよび凝集に関連する疾患の治療および検出において治療上および診断上有用である。

20

【背景技術】

【0003】

発明の背景

先進国の人口の約3分の1が癌による死を運命付けられている。現行の癌の治療は、化学療法および放射線療法を含め、正常細胞よりも優先的に癌細胞を殺すこと、腫瘍成長の緩徐化のまさにぎりぎりのところまで顕著な副作用を受け入れるいわゆる「治療域」に基づいている。正常細胞を温存する特異的な治療が差し迫って必要である。

30

【0004】

癌細胞は、細胞内および細胞表面でのタンパク質のミスフォールディング傾向を含む、多くの点で正常細胞と異なっている。このようなミスフォールドタンパク質は、生殖細胞または体細胞突然変異、染色体転座または異数性、化学療法または放射線療法の突然変異誘発作用、シャペロンのタイトレーション、小胞体および細胞表面を含む他の分泌コンパートメントにおける分子クラウディング、異常なグリコシル化および輸送、クリアランスおよび/または分解の障害、腫瘍床に関連した環境ストレス因子またはアロステリックな影響(低pHまたは高リガンド濃度など)、ならびに選択残基の酸化およびニトロ化を含む翻訳後修飾の結果であり得る。癌に関連するこれらの因子の総てまたは一部は、より大きな動的機能および非癌性細胞においては通常まれにしか接近できない特定のタンパク質領域の正味の溶媒露出に寄与する。疾患特異的エピトープ(DSE)と呼ばれる、これらの異常に露出されるタンパク質モチーフの抗体認識は、診断用の癌マーカーまたは癌の治療標的として役立ち、癌および他の疾患における異常な細胞成長への洞察が得られるであろう。

40

【0005】

プリオンタンパク質(PrP)の疾患特異的エピトープは、伝達性海綿状脳症の診断および治療標的として最近記載された(Paramithiotis et al, Nature Medicine 2003, 9(7):893)。このプリオンDSEは、コアトリマーYYRによって定義され、病的ミスフォールドPrP^SCの分子表面に露出したエピトープであるが、正常プリオンタンパク質PrP^Cの抗体が接近できない内部に埋もれている。PrP^Cは、正常な循環リンパ細胞およ

50

び骨髄細胞によって豊富に発現され(Cashman et al, Cell 1990, 61(1):185)、C D 3 4 + 骨髄幹細胞からの造血系分化に役割を果たす(Dodelet and Cashman, Blood 1998, 91(5):1556)。しかしながら、Y Y R 表面の免疫反応性は、混合系譜の脾細胞および解離した脳細胞を含む、いずれの正常細胞でも検出されることがない。

【 0 0 0 6 】

U S 2 0 0 9 / 0 1 7 5 8 8 4 では、ある種の癌細胞がミスフォールド型の P r P に対してユニークな Y Y R エピトープに対して生成した抗体と反応性があることが確認され、癌細胞の成長および/または増殖を阻害するための Y Y R 抗体の使用が提案されている。クロイツフェルト - ヤコブ病 (C J D) などの伝達性海綿状脳症を治療する方法として、P r P 凝集の進行を制御するための Y Y R 抗体の生産およびそれらの使用は、米国特許第 7 , 0 4 1 , 8 0 7 号に最初に記載された。W O 2 0 1 0 / 0 9 9 6 1 2 では、P r P のミスフォールドの際に露出する別の潜在的エピトープ、すなわち、トリマー Y M L の標的化を提案している。また、W O 2 0 1 0 / 0 4 0 2 0 には、P r P を含む様々な標的タンパク質におけるミスフォールディング「ホットスポット」を推定するために有用なアルゴリズムが記載されている。それらの発明者らは、例えば、それらの標的タンパク質のミスフォールディングが関連する疾患を治療するための手段として、推定された疾患特異的エピトープを、抗体を用いて標的化することを示唆している。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 7 】

本発明の1つの目的は、ミスフォールド型の P r P に選択的に結合する抗体、そのフラグメントおよび複合体を提供することである。

20

【 0 0 0 8 】

本発明のさらなる目的は、特に治療および診断使用のための組成物としてのこのような抗体、フラグメントおよび複合体を提供することである。

【 0 0 0 9 】

本発明のさらなる目的は、それを必要とする被験体において、表面にミスフォールド P r P を提示する罹患細胞の成長および/または増殖を制御するために有用な方法を提供することである。

【 0 0 1 0 】

本発明のさらなる目的は、それを必要とする被験体において、伝達性海綿状脳症などの P r P の凝集が関連する疾患を治療する手段として、P r P 凝集の進行を制御するために有用な方法を提供することである。

30

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 1 】

発明の概要

本発明は、ミスフォールド型の P r P に選択的に結合する抗体を提供する。より詳しくは、ここで、そのミスフォールド状態においてのみ P r P により提示されるエピトープに選択的に結合する抗体を提供する。本抗体は、その野生型、すなわち、本来のフォールドコンフォメーションの P r P との結合親和性はほとんど示さないか、全く示さない。このエピトープは、アミノ酸配列 M D E Y S N Q N N (配列番号 1 4) で定義され、リジッドループとして知られる P r P の領域に存在する。このエピトープに対して生成した抗体はミスフォールド P r P に対して結合優先性を示すことが見出されている。これらの抗体、ならびにそれらに基づくそれらの結合フラグメントおよび免疫複合体は、様々な診断および治療適用に有用性を見出す。

40

【 0 0 1 2 】

よって、第 1 の態様において、本発明は、配列 M D E Y S N Q N N (配列番号 1 4) を含んでなるエピトープに対する結合選択性を特徴とする抗体であって、重鎖と軽鎖を含んでなり、各鎖は定常領域と可変領域を有し、各可変領域はフレームワーク領域と相補性決定領域 (C D R) を含んでなり、前記 C D R は下記に示されるアミノ酸配列を含んでなる

50

抗体を提供する：

重鎖としては：

C D R 1 T Y A M G (配列番号 1)

C D R 2 V I T K S G N T Y Y A S W A K G (配列番号 2)

C D R 3 Y G I G V S Y Y D I (配列番号 3)

軽鎖としては：

C D R 1 Q S S Q S L Y N K N W L S (配列番号 4)

C D R 2 K A S T L E S (配列番号 5)

C D R 3 Q G E F S C S S A D C T A (配列番号 6)。

【 0 0 1 3 】

実施態様において、本発明は、重鎖と軽鎖を含んでなり、各鎖は定常領域と可変領域を有し、前記重鎖可変領域は配列番号 8 の配列を含んでなり、前記軽鎖可変領域は配列番号 7 の配列を含んでなる P r P 抗体を提供する。よって、本抗体は、配列番号 7 に存在する C D R 1、C D R 2 および C D R 3、ならびに配列番号 8 に存在する C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含んでなる。それらの C D R の厳密な配列は、抗体技術において標準的な実施を用いて決定される。抗体内の C D R の位置は、K a b a t ナンバリングシステムを参照してアミノ酸残基を符番することによって決定される。

【 0 0 1 4 】

この抗体（本明細書では a b 1 2 0 と呼称）は、ミスフォールド型の P r P を提示する卵巣癌細胞に対する結合親和性と、正常な卵巣上皮細胞に比べてのこれら卵巣癌細胞に対する明らかな結合優先性の両方を示す。よって、本抗体は、卵巣癌の検出および治療において使用するのに極めてよく適合している。

【 0 0 1 5 】

関連の態様において、本発明は、ミスフォールド P r P に対する結合親和性と選択性を保持する本抗体のフラグメントならびに本抗体または抗体フラグメントを組み込んだ免疫複合体を提供する。実施態様において、抗体フラグメントは、一価または二価抗体フラグメントである。他の実施態様では、免疫複合体は、ミスフォールド P r P を処置または検出するために有用な薬剤とコンジュゲートされた本抗体または抗体フラグメントを含んでなる。この薬剤は、毒素または任意の検出可能な標識であり得る。免疫複合体は、ミスフォールド P r P をサンプル中のタンパク質それ自体として、または無傷な細胞および組織上の罹患細胞表面タンパク質として検出するために有用であり得る。

【 0 0 1 6 】

特定の態様において、本発明はさらに、ウレアーゼと、それとコンジュゲートされた本発明の抗体に由来する抗原結合部位とを含んでなる免疫複合体を提供する。

【 0 0 1 7 】

さらなる態様において、本抗体、結合フラグメントまたは免疫複合体は、使用のために処方され、従って、続いての医学的使用のための薬学的に許容可能な担体、または続いての診断的使用のための生理学上耐用性のあるビヒクルをさらに含んでなる組成物として提供される。

【 0 0 1 8 】

別の態様において、本発明は、リジッドループに抗体が接近可能なミスフォールド型の P r P（すなわち、ミスフォールド P r P + 表現型を有する）を提示する罹患細胞の成長または増殖を制御するための方法であって、罹患細胞を罹患細胞の成長および/または増殖を制御するために有効な量の本抗体、フラグメントまたは免疫複合体で処理することを含んでなる方法を提供する。関連の態様において、本方法は、ミスフォールド P r P 陽性の癌細胞の治療に使用される。実施態様において、抗体、フラグメントまたは複合体は、特に卵巣癌の治療に使用される。

【 0 0 1 9 】

別の態様において、本発明は、伝達性海綿状脳症において P r P ミスフォールディングの進行または内因性 P r P 凝集の進行を制御するための方法であって、ミスフォールド P

10

20

30

40

50

r P を、P r P 凝集を阻害するために有効な量の本抗体に曝す工程を含んでなる方法を提供する。関連の態様において、本発明は、ミスフォールド P r P またはその凝集物のクリアランスを果たすために十分な量の本抗体を被験体に投与することによって内因性 P r P 凝集の進行を阻害するための方法を提供する。

【 0 0 2 0 】

他の態様において、本発明は、サンプル中のミスフォールド P r P を検出するためのアッセイであって、(a) 前記サンプルを、ヒト P r P のアミノ酸配列 M D E Y S N Q N N (配列番号 1 4) を含んでなるエピトープに結合する抗体、そのフラグメントまたは免疫複合体と、前記抗体とミスフォールド P r P の間で複合体の形成を可能とする条件下で接触させる工程、および (b) 複合体の形成を検出する工程を含んでなり、その存在が前記

10

【 0 0 2 1 】

さらに他の態様において、本発明は、プリオン疾患および癌などの P r P ミスフォールディングが関連する病態を有する被験体を同定するためのスクリーニング方法であって、被験体から得た生体サンプルにおいてミスフォールド P r P を検出する工程を含んでなる方法を提供し、該方法は、(a) 前記生体サンプルを、ヒト P r P のアミノ酸配列 M D E Y S N Q N N (配列番号 1 4) を含んでなるエピトープに結合する抗体、そのフラグメントまたは免疫複合体と、前記抗体とミスフォールド P r P の間で複合体の形成を可能とする条件下で接触させる工程、および (b) 複合体の形成を検出する工程を含んでなり、その存在が前記サンプル中のミスフォールド P r P の存在の指標となる。

20

【 0 0 2 2 】

関連の態様において、本発明は、本発明のアッセイおよびスクリーニング方法を実施するために有用なキットを提供し、該キットは、本発明による抗体、またはその結合フラグメントまたは免疫複合体と、本明細書に記載のアッセイまたはスクリーニング方法に従ったその使用に関する説明書を含んでなる。

【 0 0 2 3 】

以下、本発明のこれらのまたその他の態様を添付の図面を参照しながらさらに詳しく説明する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 4 】

【 図 1 】 図 1 は、ウサギ抗血清の評価を示す。A . 免疫前 (白い四角) および採血 2 (黒い四角) ウサギ抗血清を B S A - D S E 3 ペプチドとの結合に関して調べた。B . 採血 2 抗血清を B S A (三角) および変性 P r P (丸) との結合に関して評価した。

30

【 図 2 】 図 2 は、7 種類の抗 D S E 3 モノクローナル抗体の抗ペプチド結合を示す。各抗体を B S A に無関係なペプチド (三角) および B S A - D S E 3 ペプチド (丸) との結合に関して評価した。陽性対照抗 B S A 抗体は、両方の B S A - ペプチドに結合した。

【 図 3 】 図 3 は、7 種類の抗 D S E 3 モノクローナル抗体の抗 P r P 結合を示す。各抗体を変性組換え P r P (丸) および H i s タグを有する捕捉 P r P (三角) との結合に関して評価した。対照抗 P r P 抗体は、変性 P r P および H i s タグを有する捕捉 P r P の双方に結合した。

40

【 図 4 】 図 4 は、腫瘍細胞および正常細胞との抗 P r P 抗体の結合を示す。D S E 3 a b 1 2 0 抗体または対照抗 P r P 抗体を、種々の細胞とともに 1 0 μ g / m L でインキュベートした。抗ウサギ I g G - A F 4 8 8 または抗マウス I g G - A F 4 8 8 二次抗体を用いて抗体結合を検出した後、フローサイトメトリー (B D F A C S C a n t o I I) による蛍光評価を行った。

【 図 5 】 図 5 は、腫瘍細胞および正常細胞との抗体の結合の力価測定を示す。D S E 3 a b 1 2 0 抗体または対照抗 P r P 抗体 (6 H 4) を、3 種類の腫瘍細胞および 2 種類の正常細胞とともに種々の濃度でインキュベートした。抗体検出は図 4 に関して記載した通りであった。

【 図 6 】 図 6 は、プロテイナーゼ K 力価測定で決定された、種々の腫瘍細胞株の表面に存

50

在するPrPのコンフォメーション状態を明らかにしたものである。示されているように、プロテイナーゼK感受性は、試験したPrPの形態の範囲内では、N末端領域で高く（上向きの三角）、C末端領域で低く（下向きの三角）、リジッドループ領域では中間的である（四角）。

【図7】図7は、卵巣腫瘍細胞によって提示されるPrPの方が、正常な卵巣上皮細胞で提示されるPrPの場合より、プロテイナーゼK消化に対する感受性が高いことを示す。

【図8】図8は、正常細胞（破線）および卵巣腫瘍細胞（実線）との抗体の結合に及ぼすパクリタキセル処理の影響を示す。

【図9】図9は、ウレアーゼとコンジュゲートされたAMF-1c-120の結合特性を明らかにしたものである。A．特異的ペプチド（黒い記号）および非特異的ペプチド（白い記号）とのAMF-1c-120（四角）およびAMF-1c-120/ウレアーゼ複合体（三角）の結合。B．変性PrP（黒い記号）および捕捉His-PrP（白い記号）とのAMF-1c-120（四角）およびAMF-1c-120/ウレアーゼ（三角）の結合。

10

【図10】図10は、腫瘍細胞および正常細胞との、AMF-1c-120およびAMF-1c-120/ウレアーゼ複合体の結合を示す。AMF-1c-120またはAMF-1c-120/ウレアーゼ複合体を、3種類の腫瘍細胞および5種類の正常細胞とともに種々の濃度でインキュベートした。抗ウサギIgG-AF488二次抗体を用いて抗体結合を検出した後、フローサイトメトリーにより蛍光評価を行った。

【図11】図11は、*in vitro*におけるAMF-1c-120/ウレアーゼの細胞傷害性を明らかにしたものである。AMF-1c-120、AMF-1c-120/ウレアーゼ複合体またはウレアーゼを腫瘍細胞とともに2時間インキュベートした。細胞を2回洗浄した後、20mM尿素とともに30分間インキュベートした。細胞生存率をWST-1の添加により評価し、その後16~20時間後に吸光度を測定した。

20

【図12】図12は、免疫不全Rag2MマウスにおけるES-2腫瘍成長に対する1c-120/ウレアーゼ療法の効果を示す。マウスに、週に3回、ビヒクル（四角）、183.3μg/kgの1c-120/ウレアーゼ（菱形）、368.7μg/kgの1c-120/ウレアーゼ（丸）またはタキソテル（三角）の*iv*処置を行った。腫瘍成長を、カリパスで腫瘍直径を測定することによりモニタリングした。腫瘍体積を式 $L \times W^2 / 2$ に従って計算した。

30

【発明を実施するための形態】

【0025】

発明の詳細な説明および好ましい実施態様

本明細書で使用する場合、用語「PrP」は、発現しプロセッシングを受けたPRP遺伝子産物を含んでなる成熟ヒトタンパク質を意味し、この成熟タンパク質は、UniProtKB/Swiss-Prot P04156の残基1-230と称される。本目的で、用語「PrP」は、ミスフォールド状態において本抗体に対する結合親和性を保持する、このタンパク質の天然変異体をさらに含む。

【0026】

「単離された抗体」とは、本明細書で使用する場合、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を意味する（例えば、ミスフォールドPrPに特異的に結合する単離された抗体は、PrPタンパク質以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない）。しかしながら、ミスフォールドヒトPrPタンパク質に特異的に結合する単離された抗体は、他種由来のミスフォールドPrPタンパク質などの他の抗原と交差反応性を持つ可能性があるが、野生型ヒトPrPとの結合親和性はほとんど示さないか、または実質的に示さない。さらに、単離された抗体は、他の細胞材料および/または化学物質を実質的に不含とすることができる。単離された抗体はまた、ヒト起源の他のタンパク質を実質的に不含とすることもできる。

40

【0027】

本発明は、配列MDEYSNQNN（配列番号14）（DSE3と呼ばれることもある

50

)の全部または抗体結合部分(少なくとも5個の連続する残基を含んでなる)を含んでなるエピトープを提示するPrPの形態との結合に対する親和性及び優先性を示すPrP抗体に関する。PrPタンパク質のこの領域は、「リジッドループ」と呼ばれ、ヒトプリオンタンパク質の残基166~174に相当する。そのノーマルコンフォメーションにおいて、このエピトープは、プリオンタンパク質内に潜在しているが、例えば、温度もしくはpHなどの条件の局部的環境遷移の結果として、または宿主細胞内の異常なタンパク質輸送の結果として、またはまだ理解されていない現象の結果として、PrPのミスフォールドの際に抗体に接近可能となる。このミスフォールド型のPrPは、例えば、数種のPrP+癌細胞の表面に見られる。罹患細胞上のその存在は本抗体の治療および診断標的となり、これを達成するための手段が本発明により提供される。

10

【0028】

よって、重要な特徴として、PrPのリジッドループとの結合親和性、ミスフォールドPrP+である卵巣癌細胞との結合親和性、正常卵巣上皮細胞に比べてのミスフォールドPrP+である卵巣癌細胞との結合優先性、および最初に上記に列挙した配列を有する相補性決定領域を含んでなる抗体が提供される。

【0029】

実施態様において、抗体は、総ての天然抗体に共通する特徴、例えば、重鎖と軽鎖を含んでなり、各鎖は定常領域と可変領域を有し、各可変領域はフレームワーク領域(FR)と相補性決定領域(CDR)を含んでなる、完全な抗体である。別法として、抗体は、一価または二価(すなわち、抗体のヒンジ領域または任意の等価物によって表すことができるリンカーを介して連結された完全な抗体の両「腕」を含んでなる抗体フラグメント)のいずれかのフラグメントとして提供される。このような二価フラグメントとしては、F(ab)₂フラグメントおよびミスフォールドPrPとの結合優先性を保持する他の任意の二価フラグメントが含まれる。特定の実施態様では、二価フラグメントは、消化およびその後のフラグメント単離のための標準的な手順を用い、例えば、親抗体のパパインに基づく消化によって作製されたF(ab')₂フラグメントである。別法として、フラグメントは、アミノ酸リンカーにより連結された軽鎖可変抗体ドメインと重鎖可変抗体ドメインからなる、いわゆる一本鎖Fv(scFv)、または軽鎖抗体ドメインと重鎖可変ドメインの間のSGGGGなどの5アミノ酸リンカーおよびGGCへのC末端システイン改変を用いて作製し、最終ダイアボディ産物をVL-SGGG-VH-GGCとした、いわゆる

20

30

【0030】

完全抗体または二価フラグメントにおいて、CDRは、下記のアミノ酸配列を含んでなる、またはからなる。

重鎖としては:

CDR1 TYAMG (配列番号1)

CDR2 VITKSGNTYYASWAKG (配列番号2)

CDR3 YGIGVSY YDI (配列番号3)

軽鎖としては:

CDR1 QSSQSLYNKNWLS (配列番号4)

CDR2 KASTLES (配列番号5)

CDR3 QGEFSCSSADCTA (配列番号6)

【0031】

これらの配列内では、CDRにつき1または2個の保存的アミノ酸置換、および1、2または3つといった多くのCDRがこのような置換を有するが、通常は、全体のCDRの中でせいぜい約5置換といったいくらかの変形形態が許容される。保存的アミノ酸ファミ

40

50

リーとしては、(i) G、A、V、L および I ; (ii) D および E ; (iii) A、S および T ; (iv) H、K および R ; (v) N および Q ; ならびに (vi) F、Y および W が含まれると考えられる。従って、「保存的配列改変」を行うことができ、そのアミノ酸配列を含有する抗体の結合特性に有意に影響を及ぼさない、または変更させないアミノ酸改変を含み得る。このような保存的改変としては、アミノ酸の置換、付加および欠失が含まれる。改変は、部位特異的突然変異誘発および PCR 媒介突然変異誘発などの当技術分野で公知の標準的な技術によって遺伝子レベルで本発明の抗体に導入することができる。

【0032】

軽鎖可変領域および重鎖可変領域のそれぞれに存在する列挙した3つのCDRに加え、完全抗体の重鎖および軽鎖は、PrPのリジッドループとの結合に好適なコンフォメーションでCDRを提供する4つの介在フレームワーク領域と、抗体エフェクター機能を付与する定常領域とを含んでなる。キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体の生産に関して十分に確立されている実践および技術に従って本CDRをアクセプター抗体にグラフトすることにより、本CDRを任意の好適なアクセプター抗体に組み込むことができる。

10

【0033】

CDR3ドメインは単独でコグネイト抗原に対する抗体の結合特異性を決定することができること、および共通のCDR3配列に基づいて同じ結合特異性を有する複数の抗体を予測どおりに作出することができることは当技術分野で周知である。例えば、Klimka et al., *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (2000); Beiboer et al., *J. Mol. Biol.* 296:833-849 (2000); Rader et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:8910-8915 (1998); Barbas et al., *J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (1994); Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:2529-2533 (1995); Ditzel et al., *J. Immunol.* 157:739-749 (1996); Berezov et al., *BIAjournal* 8:Scientific Review 8 (2001); Igarashi et al., *J. Biochem (Tokyo)* 117:452-7 (1995); Bourgeois et al., *J. Virol* 72:807-10 (1998); Levi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:4374-8 (1993); Polymenis and Stoller, *J. Immunol.* 152:5218-5329 (1994) および Xu and Davis, *Immunity* 13:37-45 (2000) 参照。また、米国特許第6,951,646号;同第6,914,128号;同第6,090,382号;同第6,818,216号;同第6,156,313号;同第6,827,925号;同第5,833,943号;同第5,762,905号および同第5,760,185号も参照。これらの参照文献のそれぞれは、引用することによりその全内容が本明細書の一部とされる。

20

30

【0034】

よって、一つの実施態様では、本発明は、本明細書記載の特定の抗体由来の1以上の重鎖および/または軽鎖CDR3ドメインを含んでなる抗体を提供し、前記抗体はミスフォールドヒトPrPに特異的に結合することができる。好ましくは、このような抗体は、(a)本明細書に記載の特定の抗体と結合に関して競合することができ;(b)機能的特徴を保持し;(c)同じエピトープに結合し;かつ/または(d)本明細書に記載の特定の抗体と類似の結合親和性を有する。別の実施態様では、本発明の抗体は、本明細書に記載の特定の抗体の、または別のPrP抗体の重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域のCDR2ドメインをさらに含んでよく、前記抗体はミスフォールドヒトPrPに特異的に結合することができる。別の実施態様では、本発明の抗体は、本明細書に記載の特定の抗体の重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域のCDR1、または別のミスフォールドヒトPrP抗体の重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域のCDR1をさらに含んでもよく、前記抗体はミスフォールドヒトPrPに特異的に結合することができる。

40

【0035】

MDEYSNQNN(配列番号14)エピトープを提示するミスフォールドPrP+罹患細胞の成長または増殖を直接阻害するために、それらの細胞毒素それ自体としての使用を可能とするために、本抗体は、補体媒介性細胞傷害性(CDC)および/または抗体依存性細胞傷害性(ADCC)などの内在機構を介してそれらの抗癌活性を発揮することが

50

できる。本抗体は、癌治療の有効性を高めるために変更されたエフェクター機能を有するように操作または選択することができると考えられる。例えば、鎖内ジスルフィド結合形成を可能とするようにFc領域にシステイン残基を導入してもよい。結果として得られるホモダイマー抗体は改善されたインターナリゼーション能を持ち得、より重要なこととしては、増強された補体依存性細胞傷害性(CDC)および/またはADCC活性を持ち得る。また、抗腫瘍活性が増強されたホモダイマー抗体も、Wolff et al, Cancer Research 53:2560-2565 (1993)に記載のように、ヘテロ二機能性架橋剤を用いて作製可能である。あるいは、二重のFc領域と増強されたCDCおよびADCC活性を有する抗体を作出することができる。

【0036】

特定の好適なアクセプター抗体は、PrP結合親和性を有することがすでに知られている抗体である。このようなドナー抗体は、最も望ましくはヒト起源であるが、それらはまたマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、霊長類などを含む非ヒト起源のアクセプター抗体に由来してもよい。現在のところ望ましいCDRを収容するために、本明細書で例示したものは異なるヒト抗体アクセプター配列を同定し使用することもできると考えられる。これは、例えば、Swiss-Model [<http://swissmodel.expasy.org/repository>]または類似のソフトウェアを用いて好ましい抗体の構造をモデル化し、公開データベースで入手可能な多数のヒト抗体配列の中から、本明細書において好ましいとして変更されたCDR配列を用いて、好ましい抗体と同じ構造コンフォメーションに近いヒトアクセプター抗体配列を選択することによって達成される。実施態様において、アクセプター抗体および結果として得られる本抗体はIgG1アイソタイプであるが、IgG2またはIgG4であってもよい。さらに、定常領域により規定されるような抗体のアイソタイプは、得られる抗体のエフェクター機能を変更または消失するように操作することができる。すなわち、本抗体の定常領域は、野生型ヒト抗体定常領域、または血清半減期の延長、補体結合の低減もしくは増強、抗原依存性細胞傷害性の低減もしくは増強、および抗体安定性の改善などのために定常領域のエフェクター機能を変更するアミノ酸改変、すなわち、アミノ酸の付加、置換もしくは欠失を組み込んだ、その変異体のいずれかである。定常領域におけるアミノ酸改変の数は通常、20以下、例えば1~10、例えば1~5個の改変(保存的アミノ酸置換を含む)である。

【0037】

実施態様において、抗体の半減期は、1以上のアミノ酸改変を、通常には、例えばThrを導入するためには残基252、例えばSerを導入するためには残基254、および/または例えばPheを導入するためには残基256におけるアミノ酸置換の形態で組み込むことによって改善される。IgGのFc領域のCH2ドメインの2つのループに見られるものなどのサルベージ受容体モチーフを導入するためにCH1またはCL領域を変更することによるなど、半減期を改善するためにさらに他の改変を行うこともできる。このような変更は、例えば、US5869046およびUS6121022に記載されている。

【0038】

C1q結合の変更、または補体依存性細胞傷害性の低減は、US6194551に記載されているように、定常領域アミノ酸の329番、331番および322番を変更することによって導入することができる。抗体の補体結合能は、WO94/029351に記載されているように、定常領域の231番および239番に置換を導入することによってさらに変更することができる。

【0039】

本抗体およびフラグメントの軽鎖および重鎖のフレームワーク領域はまた、本明細書に明示されるCDRを組み込んだこと以外はヒト抗体可変領域の配列を有することが望ましい。実施態様において、重鎖可変領域は、ヒトIgG4を起源とし、エフェクター機能に関しては一般に不活性であると考えられる。特定の実施態様では、重鎖可変領域は、Genbank gi 2414502と呼称される配列を有するヒトIgG1抗体変異体な

10

20

30

40

50

どのヒト I g G の重鎖である。あるいは、重鎖可変領域は、G e n b a n k g i 2 4 1 4 5 0 2 と呼称されるヒト I g G 4 抗体種の重鎖である。

【 0 0 4 0 】

本抗体の重鎖および軽鎖のフレームワーク領域はまた、抗体のヒト化のために確立された技術に従って、抗体またはフラグメントの特性をさらに改善するアミノ酸改変、すなわち、アミノ酸欠失、付加または置換を組み込むこともできる。このようなフレームワーク改変は、公開データベースで提供されている抗体配列のフレームワーク領域、および P r P と結合することが知られている抗体、例えば、本明細書の背景の節で言及した抗体のフレームワーク領域でモデル化することができる。好ましいフレームワーク置換は、罹患細胞に関連するミスフォールド P r P との大きな結合優先性を有する抗体を生じるものである。

10

【 0 0 4 1 】

フレームワーク改変はまた、例えば、C a r r r により U S 2 0 0 3 / 0 1 5 3 0 4 3 に記載されているように、抗体の免疫原性を低減するためまたは T 細胞エピトープを低減もしくは除去するために行うこともできる。

【 0 0 4 2 】

本発明の抗体はまた、1 以上のグリコシル化部位を除去するため、および/または抗体の物理的安定性を向上させるために可変領域を変更することもできる。例えば、一つの実施態様では、抗体の物理的安定性は、可変領域の 2 2 8 番のセリンをプロリン残基で置換することによって向上される（すなわち、この抗体は、S 2 2 8 P 突然変異を含んでなる可変領域を有する）。S 2 2 8 P の変更は、鎖内ジスルフィド結合の形成に対して抗体構造を有意に安定化させる。別の実施態様では、可変領域は、可変領域に存在する 1 以上のグリコシル化部位を除去するように変更される。より詳しくは、本抗体の配列においては、グリコシル化を生じやすい部位を除去することが望ましい。これは、親可変領域中に存在する 1 以上の N - X - (S / T) 配列（ここで、X は任意のアミノ酸残基である）の存在率を、特に N 残基および/または S もしくは T 残基を置換することにより変更することによって達成される。

20

【 0 0 4 3 】

本発明の抗体は、様々な定常領域を含むように操作することができる。一つの実施態様では、本抗体は、ヒト I g G 1 定常領域などのヒト起源の抗体の定常領域に相当する配列の定常領域を含んでなる。特定の実施態様では、前記定常領域は、エフェクター機能に関しては不活性である（例えば、エフェクター機能を本質的に欠いている）。特異的实施態様では、定常領域は、ヒト I g G 4 定常領域である。

30

【 0 0 4 4 】

本発明の実施態様によれば、重鎖可変領域および軽鎖可変領域は、下記のように、配列番号 8 の重鎖可変領域および/または配列番号 7 を有する軽鎖可変領域を含んでなる。

軽鎖可変領域 (V L) :

【 化 1 】

MDTRAPTQLLGLLLLLLWLPGATFAQVLTQTSPVSAAVGGTVTINCQSSQSLYNKNWLSWYQKKPGQPPKLLI
YKASTLESQVSSRFKSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCQGEFSCSSADCTAFGGGTEVVV [配列番号 7]

40

重鎖可変領域 (V H) :

【 化 2 】

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSVEESGCHLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSTYAMGWVRQAPGKGLEWIGVITKS
GNTYYASWAKGRFAISKSTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCGRYGIGVSYDIWPGTLVTVSSGQ [配列番号 8]

【 0 0 4 5 】

よって、本抗体は、I g A、I g D、I g E、I g G および I g M を含むいずれの有用なクラスであってもよく、I g G 1、I g G 2、I g G 3、および I g G 4 を含むいずれのアイソタイプであってもよい。好ましい抗体は I g G 1 である。より具体的な好ましい

50

実施態様では、完全抗体の全軽鎖および重鎖は、それぞれ配列番号 9 および 10 として以下に示す。

【 0 0 4 6 】

全軽鎖：

【 化 3 】

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGATFAQVLTQTPSPVSAAVGGTVTINCQSSQSLYNKNWLSWYQKKPGQPPKLLI
YKASTLESGVSSRFKSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCQGEFSCSSADCTAFGGGTEVVVKGDPVAPT
LIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYN
SH
KEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC [配列番号 9]

10

【 0 0 4 7 】

全重鎖：

【 化 4 】

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSVEESGGHLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSTYAMGWVRQAPGKGLEWIGVITKS
GNTYYASWAKGRFAISKTSTTVDLKITSPPTEDTATYFCGRYGIGVSYDIWGPGLTVTVSSGQPKAPSVFP
LAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYLSVSVTSSSQPVTCNV
AHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFI FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQDDPEVQFTWY
INNEQVRTARPPLEQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYT
MGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGYSFLYSKLSVPTSEWQRGDV
FTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK [配列番号 10]

20

【 0 0 4 8 】

さらに別の実施態様では、F c 領域は、抗体の抗体依存性細胞傷害性 (A D C C) 媒介能を増強するため、および/または F c 受容体に対する抗体の親和性を増強するために、以下の位置の 1 以上のアミノ酸を改変することによって改変される：238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438 または 439。このアプローチは、P C T 公開 W O 0 0 / 4 2 0 7 2 にさらに記載されている。さらに、ヒト I g G 1 上の F c R 1、F c R I I、F c R I I I および F c R n に関する結合部位がマッピングされ、結合が改善された変異体が記載されている (Shields et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604 参照)。256、290、298、333、334 および 339 番における特異的突然変異は、F c R I I I との結合を改善することが示された。さらに、下記の組合せの変異株が F c R I I I 結合を改善することが示された：T 2 5 6 A / S 2 9 8 A、S 2 9 8 A / E 3 3 3 A、S 2 9 8 A / K 2 2 4 A および S 2 9 8 A / E 3 3 3 A / K 3 3 4 A。

30

【 0 0 4 9 】

本開示の抗体は、軽鎖可変領域または重鎖可変領域のいずれかに 1 以上のグリコシル化部位を含み得る。このようなグリコシル化部位は、抗原結合が変更されているために、抗体の免疫原性の増強または抗体の p K の変更をもたらす得る (Marshall et al (1972) Ann u Rev Biochem 41:673-702; Gala and Morrison (2004) J Immunol 172:5489-94; Wallic k et al (1988) J Exp Med 168:1099-109; Spiro (2002) Glycobiology 12:43R-56R; Par ekh et al (1985) Nature 316:452-7; Mimura et al. (2000) Mol Immunol 37:697-706)。グリコシル化は、N - X - S / T 配列を含むモチーフにおいて起こることが知られている。場合によっては、可変領域グリコシル化を含まない抗体を取得することが好ましい。これは可変領域にグリコシル化モチーフを含まない抗体を選択するか、またはグリコシル化領域内の残基を変異させるかのいずれかによって達成することができる。

40

【 0 0 5 0 】

50

例えば、脱グリコシル化(aglycosylated)抗体が作製可能である(すなわち、グリコシル化が無い)。グリコシル化は、例えば抗原に対する抗体の親和性を高めるために変更することができる。このような糖鎖改変は、例えば、抗体配列内の1以上のグリコシル化部位を変更することによって達成することができる。例えば、1以上の可変領域フレームワークグリコシル化部位の除去をもたらして、それにより、その部位のグリコシル化を除去するように1以上のアミノ酸置換を行うことができる。このような脱グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を高め得る。例えば、米国特許第5,714,350号および同第6,350,861号参照。

【0051】

加えて、またはその代わりに、本抗体は、フコシル残基の量が低減された低フコシル化抗体またはバイセクティング(bisecting)GlcNAc構造が増加した抗体など、グリコシル化のタイプの変更を有することもできる。このような変更されたグリコシル化パターンは、抗体のADCC能を増強することが示されている。このような糖鎖改変は、例えば、変更されたグリコシル化機構を有する宿主細胞内で抗体を発現させることによって達成することができる。変更されたグリコシル化機構を有する細胞は当技術分野で記載されており、本発明の組換え抗体を発現させて、それにより、変更されたグリコシル化を有する抗体を生産するための宿主細胞として使用することができる。例えば、細胞株Ms704、Ms705、およびMs709はフコシルトランスフェラーゼ遺伝子FUT8((1,6)-フコシルトランスフェラーゼ)を欠き、従って、Ms704、Ms705、およびMs709細胞株で発現した抗体はそれらの糖鎖にフコースを欠く。Ms704、Ms705、およびMs709細胞株は、2つの置換ベクターを用い、CHO/DG44細胞におけるFUT8遺伝子の標的破壊によって作出された(米国特許公報第20040110704号およびYamane-Ohnuki et al. (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22参照)。別の例として、EP1,176,195には、フコシルトランスフェラーゼをコードする、機能的に破壊されたFUT8遺伝子を有する細胞株が記載され、この場合、このような細胞株で発現した抗体は(1,6)結合関連酵素を減少または消失させることによって低フコシル化を呈する。EP1,176,195にはまた、抗体のFc領域に結合するN-アセチルグルコサミンにフコースを付加する酵素活性が低いか、または酵素活性を持たない細胞株、例えば、ラット骨髄腫細胞株YB2/0(ATCC CRL 1662)も記載されている。PCT公開WO03/035835には、Asn(297)結合糖鎖にフコースを付加する能力が低減され、その結果、この場合にも、その宿主細胞において発現した抗体の低フコシル化をもたらす変異型CHO細胞株であるLec13細胞が記載されている(Shields et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740もまた参照)。また、PCT公開WO06/089231に記載されているように、グリコシル化プロファイルが改変された抗体もニワトリ卵で作製することができる。あるいは、グリコシル化プロファイルが改変された抗体は、アオウキクサ属(Lemna)などの植物でも産生可能である。植物系で抗体を生産するための方法は、2006年8月11日出願のAlston & Bird LLP弁理士事件番号040989/314911に相当する米国特許出願に開示されている。PCT公開WO99/54342には、糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼ(例えば、(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII(GnTII))を発現するように操作された細胞株が記載され、この場合、操作された細胞株で発現した抗体はバイセクティング(bisecting)GlcNAc構造の増加を示し、それらの抗体のADCC活性の増強をもたらす(Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180もまた参照)。あるいは、抗体のフコース残基は、フコシダーゼ酵素を用いて切断することもでき、例えば、フコシダーゼ-L-フコシダーゼは、抗体からフコシル残基を除去する(Tarentino et al. (1975) *Biochem.* 14:5516-23)。

【0052】

さらに、本抗体は、例えば、抗体の生体(例えば、血清)半減期を延長するためにペグ化することができる。抗体をペグ化するためには、抗体またはそのフラグメントを、一般には、1以上のPEG基が本抗体または抗体フラグメント結合するようになる条件下で、

10

20

30

40

50

PEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体などのポリエチレングリコール(PEG)と反応させる。好ましくは、ペグ化は、反応性PEG分子(または類似の反応性水溶性ポリマー)とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して行われる。本明細書で使用する場合、用語「ポリエチレングリコール」は、モノ(C1-C10)アルコキシ-またはアリーロキシ-ポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコール-マレイミドなどの他のタンパク質を誘導体化するために使用されているPEGの形態をいずれも包含するものとする。特定の実施態様では、ペグ化される抗体は脱グリコシル化抗体である。タンパク質をペグ化するための方法は当技術分野で公知であり、本発明の抗体に適用することができる。例えば、EP0154316およびEP0401384参照。

【0053】

よって、本発明は、上記で最初に列挙したCDR配列を含んでなる抗体を含み、そうでなければ、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体またはそうでなければ操作抗体であり得る。

【0054】

抗体および結合フラグメントは、ミスフォールドPrPの内在水部位を同定するためのin vivoイメージングを含む診断目的と、ミスフォールドPrPを可溶性タンパク質としてまたは細胞保有表面タンパク質として検出するためのサンプル検査目的の両方に有用である。抗体および結合フラグメントはまた、ミスフォールドPrPが関連する疾患を治療するための治療目的にも有用である。

【0055】

どちらの目的でも、抗体または結合フラグメントは、適当な薬剤とコンジュゲートして免疫複合体を形成することができる。疾患を治療するために適当な薬剤には、化学療法薬および放射線療法薬を含む細胞傷害性薬剤または毒素が含まれる。診断目的では、適当な薬剤は、全身イメージング用の放射性同位元素または蛍光マーカー、およびサンプル検査用の放射性同位元素、酵素、蛍光標識を含む検出可能な標識である。これらの診断アプローチでは、薬剤は、標識として、直接的、それ自体で、または薬剤と結合する標識された二次抗体などの望ましい標識と結合する薬剤として間接的に機能することができる。

【0056】

診断薬としては、検出可能な標識は、ビオチン/ストレプトアビジンを含む粒子標識、金コロイドなどの金属ゾル、例えば、N₂S₂、N₃SまたはN₄タイプのペプチドキレート剤とともに提供されるI¹²⁵またはTc⁹⁹などの放射性同位元素、FITCおよびPEなどの蛍光マーカーを含む発色団、発光マーカー、リン光マーカーなど、ならびにある基質を検出可能なマーカーに変換する酵素標識、およびポリマーゼ連鎖反応などによる増幅の後に明らかにされるポリヌクレオチドタグを含め、in vitro診断薬の分野で現在使用されている様々なタイプのうちのいずれであってもよい。好適な酵素標識としては、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼなどが含まれる。例えば、標識は、アダマンチルメトキシホスホリルオキシフェニルジオキセタン(AMPDP)などの1,2ジオキセタン基質、3-(4-(メトキシスピロ{1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ)トリシクロ{3.3.1.1.3,7}デカン}-4-イル)フェニルリン酸二ナトリウム(CSPD)、ならびにCDPおよびCDP-star(登録商標)または当業者に周知の他の発光基質、例えば、テルビウム(III)およびユウロピウム(III)などの好適なランタニドのキレート、の変換後の化学発光の存在または形成を測定することによって検出されるアルカリ性ホスファターゼ酵素であってもよい。検出手段は、選択された標識によって決定される。標識またはその反応生成物の出現は、標識が粒子または染色性であって、適当なレベルで蓄積する場合には裸眼で、または分光光度計、照度計、蛍光計などの装置を用い、全て標準的な実施に従って達成することができる。

【0057】

同様に、イメージング剤も当該組成物中に、またはさらなる組成物中に含まれてよい。好適なイメージング剤としては、陽電子放射断層撮影法(PET)、コンピューター断層

10

20

30

40

50

撮影法 (CAT)、単光子放射コンピューター断層撮影法、X線、蛍光透視法、および磁気共鳴イメージング (MRI) に使用される市販の薬剤が含まれる。

【0058】

ブランクまたは他の形態において内在する癌部位またはミスフォールドPrPに関してスクリーニングするために抗体とともに有用なイメージング剤としては、金属、放射性同位元素および放射線不透過性剤 (例えば、ガリウム、テクネチウム、インジウム、ストロンチウム、ヨウ素、バリウム、臭素およびリン含有化合物)、放射線透視剤、造影剤、色素 (例えば、蛍光色素および発色団) ならびに比色定量または蛍光定量反応を触媒する酵素が含まれる。一般に、このような薬剤は、上記のような様々な技術を用いて付着または捕捉させてもよく、いずれの配向で存在してもよい。例えば、米国特許第6,159,443号および同第6,391,280号参照 (両方とも引用することにより明示的に本明細書の一部とされる)。

10

【0059】

本発明による造影剤は、X線造影剤、光イメージングプローブ、スピン標識または放射性単位などのイメージング法において有用である。MRIにおいて造影剤として使用するための好適な剤用の例としては、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) およびガドペンテートジメグルミン (gadopentotate dimeglumine) などの現在利用可能なガドリニウムキレート、ならびに鉄、マグネシウム、マンガン、銅、およびクロムが含まれる。CATおよびX線に有用な材料の例としては、ジアトリゾアート、イオタラメートにより代表されるイオン性モノマー、イオパミドール、イソヘキソール、およびイオベルソールなどの非イオン性モノマー、イオトロールおよびイオジキサノールなどの非イオン性ダイマー、ならびにイオン性ダイマー、例えば、イオキサガルト (ioxagalte) などのヨウ素系材料が含まれる。

20

【0060】

PETスキャンとともに使用するための好ましい薬剤としては、 N^{13} およびフルオロデオキシグルコース (FDG) が含まれる。

【0061】

療法では、細胞毒素は、非共有結合的相互作用を介して抗体または結合フラグメントとコンジュゲートさせることができるが、より望ましくは直接的な共有結合により、あるいは、より好ましくは好適なリンカーを介した共有結合により、抗体または結合フラグメントとコンジュゲートさせることができる。好ましい実施態様では、複合体は、細胞毒素と抗体またはその任意の結合フラグメントを含んでなる。抗体と細胞毒素の免疫複合体は、様々な二機能性タンパク質カップリング剤 (例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール) プロピオネート、イミノチオラン)、イミドエステルの二機能性誘導体 (例えば、アジピミド酸ジメチルHCl)、活性エステル (例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド (例えば、グルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物 (例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアン酸塩 (例えば、2,6-ジイソシアン酸トルエン)、およびビス-活性フッ素化合物 (例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン) を用いて製造される。 C^{14} 標識1-イソチオシアノベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸 (MX-DTPA) は、放射性核種と抗体のコンジュゲーションに好適なキレート剤である。1つの特に有用なリンカーが、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルおよびヨードアセチル反応性基を介したアミンとスルフヒドリルのコンジュゲートのための中程度の長さの架橋剤であるスクシンイミジル-(4-ヨードアセチル) アミノベンゾエート (SIAB) である。

30

40

【0062】

免疫複合体の細胞毒素成分は、化学療法薬、細菌、真菌、植物もしくは動物起源の酵素的に活性な毒素またはそのフラグメント、または小分子毒素などの毒素、あるいは ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{111}In 、 ^{90}Y および ^{186}Re などの放射性同位元素、あるいは標的罹患細胞の成長または増殖を阻害する働きをする他の任意の薬剤といった、抗体により標的とされる細胞に対して細胞傷害性のあるいずれの薬剤であってもよい

50

【 0 0 6 3 】

このような免疫複合体において有用な化学療法薬としては、メイタンシノイド（例えば、DM-1およびDM-4）、アドリアマイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド（「Ara-C」）、シクロホスファミド、チオテパ、ブスルファン、シトキシン(cytoxin)、タキサン（例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル）、タキソテール、メトトレキサート、シスプラチン、メルファラン、ピンブラスチン、プレオマイシン、エトポシド、イフォサミド(ifosamide)、マイトマイシンC、ミトキサントロン、ピンクリスチン、ピノレルピン、カルボプラチン、テニポシド、ダウノマイシン、カルミノマイシン、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラミシン、5-FU、6-チオグアニン、6-メルカプトプリン、アクチノマイシンD、VP-16、クロラムブシル、メルファラン、および他の関連のナイトロジェンマスタードが含まれる。また、タモキシフェンおよびオナプリストンなどの腫瘍に対してホルモン作用を調節または阻害する働きをするホルモン剤も有用である。使用可能な毒素およびそのフラグメントとしては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性フラグメント、コレラ毒素、ボツリヌス菌毒素、外毒素A鎖（緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)由来）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシンA鎖、 α -サルシン、シナアブラギリ(*Aleurites fordii*)タンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ(*Phytolacca Americana*)タンパク質(PAPI、PAPII、およびPAP-S)、ニガウリ(*Mordica charantia*)阻害剤、クルシン、クロチン、サボンソウ(*sapaonaria officinalis*)阻害剤、ゲロニン、サポリン、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン、およびトリコテセンが含まれる。小分子毒素としては、例えば、カリケアマイシン、パリトキシンおよびCC1065が含まれる。また、タキソールおよびパクリタキセルを含むタキサンも有用である。

【 0 0 6 4 】

1つの特定の態様において、本発明は、本明細書で特徴付けられている抗体の少なくとも1つの抗原結合部位とコンジュゲートされた細胞傷害性成分としてウレアーゼを組み込んだ免疫複合体を提供する。免疫複合体の細胞傷害性成分としてのウレアーゼの組み込みは、文献に記載されている(US7211250およびUS7264800参照、両方ともHelix Biopharma Corporationに対するもので、両方とも引用することによりその全内容が本明細書の一部とされる)。ウレアーゼ自体は細胞傷害性ではないが、その細胞傷害性は、尿素をアンモニアなどのpH上昇化合物に変化するその能力から生じる。従って、ウレアーゼに基づく免疫複合体は、被験体の間質液にウレアーゼを加えることにより、癌細胞が曝されている間質液のpHを上昇させ得る。ウレアーゼは、基質である尿素をアンモニアとカルバミン酸塩に変換することができる。この酵素活性はpHを高めて、環境をより塩基性にし得る。癌細胞周囲の環境は、一般に酸性である(Webb, S. D., et al. (2001) Novartis Found Symp. 240:169-81)。よって、この様式で細胞外環境のpHを上昇させることにより、癌細胞の成長は阻害される。従って、本発明の特定の実施態様における、免疫複合体の添加は、間質液のpH、特にミスフォールドPrP+罹患細胞周囲のそれを少なくとも0.1pH単位、例えば、0.1~0.5pH単位またはそれを超えて上昇させる。

【 0 0 6 5 】

本明細書で使用する場合、用語「ウレアーゼ」は、尿素アミドヒドロラーゼの酵素活性を有する酵素を意味する(E.C. 3.5.1.5)。ウレアーゼはまた、全長ウレアーゼ、サブユニット、またはそのフラグメント、および/またはこのポリペプチドの尿素アミドヒドロラーゼ活性を保存するアミノ酸置換、欠失もしくは付加を有するウレアーゼを含んでなるタンパク質を含む。末端切断型ウレアーゼ配列は、本明細書で使用する場合、ウレアーゼのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかで始まる完全なウレアーゼ配列の部分を含まないウレアーゼのフラグメントである。天然ウレアーゼを単離するため、また活性フラグメントおよび修飾ウレアーゼポリペプチドを同定するための方法を以下に

示す。

【 0 0 6 6 】

本発明の実施態様において、ウレアーゼは、以下に示される配列番号 13 を有するタチナタマメウレアーゼである。

【 化 5 】

```

MKLSPREVEKLGHLNAGYLAQKRLARGVRLNYTEAVALIASQIM
EYARDGEKTVAQLMCLGQHLLGRRQVLPVPHLLNAVQVEATFP
DGTKLVTVHDPISRENGELQEALFGSLLPVPSLDKFAETKEDNR
IPGEILCEDECLTLNIGRKAVILKVTSKGRPIQVGSYHFIEV
NPYLTFDRRKAYGMRLNIAAGTAVRFEPGDCCKSVTLVSIENKV
IRGGNAIADGPNVNETNLEAAMHAVRSKGFGEHEEKDASEGFTKE
DPNCPFNFTFIHRKEYANKYGPTTGDKIRLGDTNLLAEIEKDYAL
YGDECVFVGGGKVIDRGMGQSCGHPPAISLDTVITNAVIDYGTI
IKADIGIKDGLIASIGKAGNPDMNGVFSNMIIGANTEVIAGEG
LIVTAGAIDCHVHYICPQLVYEAISSGITTLVGGGTGPAAGTRA
TTCTPSPTQMRLMLQSTDDLPLNFGFTGKSSSKPDELHEI IKA
GAMGLKLHEDWGSTPAAIDNCLTIAEHHDIQINIHTDTLNEAGF
VEHSIAAFKGRTIHTYHSEGAGGGHAPDIKVCGIKNVLPSSSTN
PTRPLTNSNTIDEHLDMLMVCHHLDRIPEDLAFHRSRIRKKTIA
AEDVLNDIGAISSISSDSQAMGRVGEVISRTWQTADKMKQAQTGP
LKCDSSDNDNFRIRRYIAKYTINPAIANGFSQYVGSVEVGKLAD
LVMWKPSFFGTPKPEMVIKGMVAWADIGDPNASIPTPEPVKMRP
MYGTLGKAGGALSIAFVSKAALDQRVNVLYGLNKRVEAVSNVRK
LTKLDMKLNLDALPEITVDPESYTVKADGKLLCVSEATTVPLSRN
YFLF [配列番号 13]

```

10

20

【 0 0 6 7 】

あるいは、ウレアーゼは、例えば、細菌、植物、真菌およびウイルスを含むいずれの起源のものであってもよい。いくつかの研究が、様々な進化的に多様な細菌、植物、真菌およびウイルスからのウレアーゼの遺伝学に関する詳細な情報を提供している (Mobley, H. L. T. et al. (1995) *Microbiol. Rev.* 59: 451-480; *Eur. J. Biochem.*, 175, 151-165 (1988); Labigne, A. (1990) 国際公開第 WO 90 / 0 4 0 3 0 号; Clayton, C. L. et al. (1990) *Nucleic Acid Res.* 18, 362; ならびに米国特許第 6, 2 4 8, 3 3 0 号および同第 5, 2 9 8, 3 9 9 号、これらはそれぞれ引用することにより本明細書の一部とされる)。特に注目されるのが植物に見られるウレアーゼである (Sirko, A. and Brodzik, R. (2000) *Acta Biochim Pol* 47(4):1189-95)。一例としての植物ウレアーゼは、タチナタマメウレアーゼである。

30

【 0 0 6 8 】

他の有用なウレアーゼ配列のアミノ酸配列は、公開データベース、例えば、Entrez (www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/) で入手可能である。さらに、多様な生物由来のウレアーゼを増幅するために有用なプライマーは、Rose, et al. (1998) *Nucl. Acids Res.* 26:1628 に記載されている CODEHOP (コンセンサス - 縮重ハイブリッドオリゴヌクレオチドプライマー (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer)) を使用することによって利用できる。

40

【 0 0 6 9 】

よって、有用な形態のウレアーゼとしては、天然型ならびに機能的に活性なその変異体が含まれる。2つの一般的なタイプのアミノ酸配列変異体が企図される。アミノ酸配列変異体は、特定のアミノ酸にウレアーゼ活性を破壊しない1または複数の置換を有するものである。これらの変異体としては、サイレント変異体および天然タンパク質と実質的に相同かつ機能的に同等の保存的改変変異体が含まれる。天然タンパク質の変異体は、そのアミノ酸配列の少なくとも約 80%、より好ましくは少なくとも約 90%、さらにより好ましくは少なくとも約 95%、いっそうさらにより好ましくは 98%、最も好ましくは少なくとも約 99% が天然タンパク質のアミノ酸配列と同一である場合に、天然タンパク質と

50

「実質的に相同」である。変異体は、1つといった少数、または10個まで、またはそれを超えるアミノ酸だけ異なり得る。

【0070】

第2のタイプの変異体としては、ウレアーゼの単離された活性フラグメントであるウレアーゼのサイズ変異体が含まれる。サイズ変異体は、例えば、ウレアーゼの断片化、化学的改変、タンパク質分解酵素消化、またはそれらの組合せによって形成することができる。さらに、遺伝子工学技術、ならびにアミノ酸残基から直接ポリペプチドを合成する方法が、サイズ変異体を作製するために使用可能である。

【0071】

「機能的に同等」とは、そのウレアーゼ変異体の配列が天然ウレアーゼと実質的に同じ生物活性を有するタンパク質を生産する鎖を定義することを意図する。実質的な配列バリエーションを含んでなるこのような機能的に同等な変異体もまた、本発明に包含される。よって、天然ウレアーゼタンパク質の機能的に同等な変異体は、治療上有用である十分な生物活性を有すると考えられる。機能的同等性を決定するための方法は当技術分野で利用可能である。生物活性は、本明細書で例示されているように、天然ウレアーゼタンパク質の活性を測定するために特に設計されたアッセイを用いて測定することができる。

10

【0072】

遺伝コードの縮重のため、ウレアーゼをコードする多数の核酸配列が作出される可能性があり、そのうちのいくつかが既知のウレアーゼ核酸配列と最小の配列相同性を用い得る。このような「サイレントバリエーション」は、下記に述べる「保存的改変バリエーション」の一種である。本発明は、ウレアーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列のいずれのコードンバリエーションも包含する。同様に、ウレアーゼポリペプチドは、既知のウレアーゼポリペプチドの配列の1以上の保存的改変バリエーション（または単に「保存的バリエーション」）を含む。このような保存的バリエーションは、1個のアミノ酸または小パーセンテージのアミノ酸を変更、付加するまたは欠失させる置換、付加または欠失を含んでなる。当業者は、配列中の1個のアミノ酸または小パーセンテージのアミノ酸（一般に、5%未満、より一般には4%、2%、1%未満、またはそれより少ない）を置換する、欠失させる、または付加する個々の置換、欠失、または付加は一般に、このような変化がアミノ酸の欠失、アミノ酸の付加、またはアミノ酸の化学的に類似するアミノ酸での置換をもたらす保存的バリエーションを構成することを認識するであろう。

20

30

【0073】

ウレアーゼタンパク質配列は、保存的置換配列を含め、タンパク質の精製のための1以上のドメイン（例えば、ポリhisセグメント、FLAGタグセグメントなど）の付加時に生じるような、より大きなポリペプチド配列の一部として存在することができ、例えば、付加的な機能ドメインが免疫複合体のウレアーゼタンパク質部分の活性にほとんどまたは全く影響を及ぼさない場合、または付加的ドメインがプロテアーゼによる処理などの合成後プロセッシング段階によって除去できる場合などがある。

【0074】

これらの活性薬剤はいずれの順序で相互連結して免疫複合体を形成してもよい。従って、ウレアーゼはターゲティング抗体のアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれに連結してもよい。抗体はまた、ウレアーゼの内部領域に連結してもよく、または逆に、その結合が分子の個々の活性に干渉しない限り、ウレアーゼを抗体の内部の位置に連結してもよい。

40

【0075】

ターゲティング抗体とウレアーゼは、当業者に周知のいくつかの手段のいずれによって結合させてもよい。一般に、活性薬剤は、直接またはリンカー（スペーサー）を介して抗体にコンジュゲートされる。しかしながら、抗体とウレアーゼの両方が完全に遺伝子にコードされる場合には、キメラ分子を融合タンパク質として組換え的に発現することが好ましい場合がある。

【0076】

50

薬剤を抗体または他のポリペプチドターゲット分子に結合させるための手順は、その薬剤の化学構造によって異なる。ポリペプチドは一般に、様々な官能基；例えば、ウレアーゼ上の好適な官能基と反応させてそれに抗体を結合させるために利用可能なカルボン酸（COOH）または遊離アミン（-NH₂）基を含む。

【0077】

あるいは、抗体および/またはウレアーゼは、付加的反応性官能基を露出または結合させるために誘導体化することができる。この誘導体化は、いくつかのリンカー分子のうちいずれの結合を含んでもよい。リンカーは、抗体とウレアーゼの両方に共有結合を形成することができる。好適なリンカーとしては、上記で最初に述べたもの、特に、直鎖または分岐鎖型炭素リンカー、複素環式炭素リンカー、またはペプチドリナーが含まれる。これらのリンカーは、それらの側基を介して（例えば、システインとのジスルフィド結合を介して）構成アミノ酸に連結することができる。しかしながら、好ましい実施態様では、これらのリンカーは、末端アミノ酸の炭素アミノ基およびカルボキシル基に連結される。

10

【0078】

特定の薬剤上の基と反応性のある1つの官能基と、抗体と反応性のある別の基を有する二機能性リンカーを、所望の免疫複合体を形成するために使用することができる。あるいは、誘導体化は、ターゲット部分の化学処理、例えば、糖タンパク質抗体の糖部分の、過ヨウ素酸塩でグリコール開裂による遊離アルデヒド基の生成を含み得る。抗体上の遊離アルデヒド基は、薬剤上の遊離アミノ基またはヒドラジン基と反応させてそれにウレアーゼを結合させることができる（米国特許第4,671,958号参照）。抗体または抗体フラグメントなどのポリペプチド上の遊離スルフィドリル基の生成のための手順は公知である（米国特許第4,659,839号参照）。

20

【0079】

抗体とウレアーゼの免疫複合体は、様々な二機能性タンパク質カップリング剤（例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート、イミノチオラン）、イミドエステルの二機能性誘導体（例えば、アジピミド酸ジメチルHCl）、活性エステル（例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビス-アジド化合物（例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン）、ジイソシアン酸塩（例えば、2,6-ジイソシアン酸トルエン）、およびビス-活性フッ素化合物（例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン）を用いて作製することができる。

30

【0080】

場合によっては、複合体がその標的部位に到達した際に抗体からウレアーゼを遊離することが望ましい。従って、標的部位の近傍で切断可能な結合を含んでなる複合体が使用され得る。この結合の切断は、酵素活性または複合体が標的細胞内もしくは標的部位の環境中で曝される条件によって促進され得る。当然のことではあるが、標的部位が腫瘍である場合、腫瘍部位に存在する条件下で（例えば、腫瘍関連酵素または酸性pHに曝された際に）切断可能なリンカーが使用可能である。pH感受性の有用なリンカーは、例えば、WO86/001409、WO94/020487、WO2009/158668およびWO2010/053596（引用することにより本明細書の一部とされる）に記載されている。

40

【0081】

いくつかの他の有用な切断可能リンカーが当業者に知られている（米国特許第4,618,492号；同第4,542,225号、および同第4,625,014号参照）。これらのリンカー基からの活性薬剤の遊離の機構としては、例えば、感光性結合の照射および酸により触媒される加水分解が含まれる。例えば、米国特許第4,671,958号は、患者の補体系のタンパク質分解酵素によって*in vivo*で標的部位において切断されるリンカーを含んでなる免疫複合体の記載を含んでいる。

【0082】

50

従って、免疫複合体は、抗体とウレアーゼを化学的にコンジュゲートすることによって作製することができる。別法として、免疫複合体は、その成分が総て遺伝子によりコードされている場合には、組換え的に作製することができる。一般に、これは、免疫複合体をコードするDNA配列を作出すること、このDNAを発現カセット内の特定のプロモーターの制御下に置くこと、このタンパク質を宿主で発現させること、発現したタンパク質を単離すること、および、必要であれば、このタンパク質を還元することを含む。

【0083】

免疫複合体を融合タンパク質としてコードするDNAは、例えば、適切な配列のクローニングおよび制限切断、またはNarang et al. (1979) Meth. Enzymol. 68: 90-99のホストトリエステル法; Brown et al. (1979) Meth. Enzymol. 68: 109-151のホスホジエステル法; Beaucage et al. (1981) Tetra. Lett., 22: 1859-1862のジエチルホスホラミダイト法; および米国特許第4,458,066号の固相支持体法などの方法による直接的化学合成を含む、いずれの好適な方法によって作製してもよい。

10

【0084】

化学合成は、一本鎖オリゴヌクレオチドを生産する。これは相補配列とのハイブリダイゼーションによるか、または一本鎖を鋳型として用いるDNAポリメラーゼでの重合により、二本鎖DNAに変換することができる。あるいは、部分配列をクローニングし、適当な部分配列を適当な制限酵素を用いて切断することもできる。次に、これらのフラグメントを連結して所望のDNA配列を作製することができる。

【0085】

これらの2つの分子は、好ましくは、本質的に直接相互連結されるが、これらの分子は1以上のアミノ酸からなるペプチドスペーサーによって分離してもよい。一般に、スペーサーは、これらのタンパク質を連結するため、またはそれらの間に最小限の距離もしくは他の空間的關係を保持するため以外には特定の生物活性を持たない。しかしながら、スペーサーの構成アミノ酸は、フォールディング、正味電荷、または疎水性などの分子のいくつかの特性に影響を及ぼすように選択してもよい。

20

【0086】

抗体軽鎖と分離した抗体重鎖からなり、このような鎖の少なくとも1つに末端ウレアーゼが組み込まれている融合タンパク質をコードする核酸配列は、大腸菌、他の細菌宿主、酵母、および種々の高等真核細胞、例えば、COS、CHOおよびHEL細胞株および骨髓腫細胞株を含む、発現産物を分泌する様々な宿主細胞で発現させることができる。組換えタンパク質遺伝子は、各宿主に適当な発現制御配列と機能的に連結される。大腸菌では、これには、T7、trpまたはプロモーターなどのプロモーター、リボソーム結合部位、および好ましくは転写終結シグナルが含まれる。真核細胞では、制御配列としては、免疫グロブリン遺伝子、SV40、サイトメガロウイルスなどに由来するプロモーターおよび好ましくはエンハンサー、ならびにポリアデニル化配列が挙げられ、さらにスプライドナー配列およびアクセプター配列を挙げることもできる。

30

【0087】

本発明のプラスミドは、大腸菌では塩化カルシウム形質転換、および哺乳類細胞ではリン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションなどの周知の方法によって、選択された宿主細胞に導入することができる。プラスミドにより形質転換された細胞は、それらのプラスミド上に含まれる、amp、gpt、neoおよびhyg遺伝子などの遺伝子によって付与される抗生物質耐性によって選択することができる。

40

【0088】

ひと度、発現および分泌されれば、組換え融合タンパク質は、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む当技術分野の標準的な手順に従って精製することができる(R. Scopes (1982) Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y.; Deutscher (1990) Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification., Academic Press, Inc. N.Y.参照)。少なくとも約90~95%の均一性の実質的に純粋な組成物が好ましく、医薬使用には98~99%またはそれ

50

を超える均一性が最も好ましい。部分的にまたは所望により均一となるまで精製されれば、それらのポリペプチドはその後治療的に使用可能である。

【0089】

本発明の一つの実施態様によれば、癌細胞を、活性薬剤と接触させる前かもしくは接触させた後、またはその両方にイメージング剤と接触させる。例えば、ウレアーゼを腫瘍細胞に標的化した後、それは例えばpH変化を介して腫瘍外部環境を変調または調節する能力を持ち得る。その後、塩基性環境を好むイメージング剤はより効能を増す。

【0090】

発光シクレン系ランタミドキレート(lanthamide chelates)および主として磁気共鳴サインを生じるものは両方ともpHの変化に感受性があることが示されている。pH変化を感知するために使用される発光プローブは一般に、ランタミドイオン(lanthamide ion)の蛍光寿命の変化をpHの関数として検出する。同様に、pHの変化を介して水プロトンの緩和を変調する磁気共鳴造影剤は本発明で有用である。両場合とも、所与の系におけるpHの変化により、増強されたコントラストを持つ薬剤を想定することができる。

【0091】

よって、pH感受性造影剤は癌細胞においてまたはその近傍で使用される。1または複数の癌細胞はまた、ウレアーゼ酵素を含有するウレアーゼ組成物に曝され、癌細胞においてまたはその近傍でpHの変化を生じる。このように、pHの変化は、水プロトンまたは水性媒体中の他の核の核磁気共鳴弛緩特性を、pHを反映する様式で変化させる。使用可能なpH感受性造影剤の例としては、Ce、Pr、Nd、Sm、Eu、Gd、Dy、Ho、Er、Tm、Ybなどのランタミド(lanthamide)金属、またはFe、Mn、17Oなどの別の常磁性元素を含有する薬剤が含まれる。使用可能な特定の造影剤としては、H(2)(17)O、GdDOTA-4AMP(5-) (Magn Reson Med. 2003 February;49(2):249-57に記載)およびFe(III)メソ-テトラ(4-スルホナトフェニル)ポルフィン(Fe-TPPS4) (Helpern et al. (1987) Magnetic Resonance in Medicine 5:302-305および米国特許第6,307,372号に記載、両方とも引用することにより本明細書の一部とされる)が含まれる。さらに、Mikawa et al. Acad. Radiol (2002) 9(suppl 1):S109-S111に記載されているようなポリイオンに基づくGdも本発明で使用可能である。

【0092】

別法として、癌細胞周囲の水性媒体にシフト試薬を提供してもよい。このシフト試薬は、pHの変化が水プロトンまたは他の核の化学シフト特性にpHを反映する様式で影響を及ぼすように構成されている。次に、化学シフト特性の変化を、核磁気共鳴を用いて測定し、その活性薬剤が生物学的に活性化どうかを決定することができる。使用可能な例示的シフト試薬としては、Ce、Pr、Nd、Sm、Eu、Gd、Dy、Ho、Er、TmもしくはYbなどのランタミド(lanthamide)金属、または別の常磁性元素を含有するものが含まれる。使用可能な特定のシフト試薬の例としては、Tm(DOTP)(5-)、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン(tetraazacyclododecane)-N,N',N'',N'''-テトラ(メチレンホスフェート)のツリウム(III)錯体、Dy(PPP)(2)(7)-ジスプロシウムトリポリホスフェートなどが含まれる。

【0093】

本発明の一つの実施態様では、Magn Reson Med (2003) February;49(2):249-57に記載されているように、MRIによるpHマップを作成するために、2種のガドリニウム剤、例えば、pH非感受性GdDOTP(5-)とpH感受性GdDOTA-4AMP(5-)を用いる二重造影剤戦略を使用することができる。

【0094】

抗体組成物

本抗体、結合フラグメントまたは複合体の治療処方物は、保存のため、所望の純度を有する抗体または複合体と任意選択の薬学的に許容可能な担体、賦形剤または安定剤(Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, Osol, A. Ed. [1980])を混合することによ

10

20

30

40

50

り凍結乾燥処方物または水溶液の形態で調製される。許容される担体、賦形剤、または安定剤は、使用される用量および濃度でレシピエントに無毒であり、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；保存剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清、アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリシンなどのアミノ酸；単糖類、二糖類、およびグルコース、マンノース、またはデキストリンを含むその他の糖鎖；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールなどの糖類；ナトリウムなどの塩形成カウンターイオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；および/またはTWEEEN、プルロニックもしくはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤が含まれる。

10

【0095】

in vivo 投与に使用対象の有効成分は無菌である。これは無菌濾過膜を介した濾過により容易に達成される。

【0096】

抗体を含んでなる診断上有用な組成物に、生理食塩水または緩衝生理食塩水（リン酸緩衝生理食塩水を含む）の溶液などの診断目的に好適な担体を任意の所望の安定剤または保存剤とともに配合する。当然のことながら、本組成物は、保存安定性を延長するために凍結乾燥形態で提供することができる。

20

【0097】

用量および投与

本抗体、結合フラグメントまたは免疫複合体は、生理学上耐用性のある、例えば、薬学的に許容可能な希釈剤、担体、または賦形剤とともに、単位投与形で、また、特定の医学的状态の治療もしくは診断に適合した総合的処置計画の一部として、または診断目的で試験体のイメージングを行うために投与することができる。

【0098】

例えば、非経口投与、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、頭蓋内投与、眼窩内投与、眼球投与、心室内投与、嚢内投与、脊髄内投与、大槽内投与、腹腔内投与、鼻腔内投与、エアゾール投与または経口投与などの任意の適当な投与経路を使用することができる。好ましくは、抗体は注入または注射のいずれかにより非経口的に投与される。

30

【0099】

抗体、ならにその結合フラグメントおよび複合体は、ミスフォールドPrPに関連する疾患および病態の治療および検出において有用である。従って、抗体、フラグメントまたは免疫複合体の有効量は、単独で、またはMDEYSNQNN（配列番号14）エピトープに抗体が接近可能なミスフォールド型のPrPを提示する罹患細胞の成長または増殖を遅延させるまたは阻害する治療計画の一部として有効な量であると考えられる。

40

【0100】

本抗体は、様々な癌の治療において、造血系細胞癌および固形腫瘍を含め、癌細胞およびそれらを含んでなる腫瘍の成長または増殖を阻害する（すなわち、癌細胞を枯渇させる）ために特に有用である。治療対象の病態または障害としては、良性または悪性腫瘍（例えば、腎臓、肝臓、腎臓、膀胱、乳房、胃、卵巣、結腸直腸、前立腺、膵臓、肺、陰門、および甲状腺）；肝癌腫；肉腫；膠芽腫；ならびに種々の頭頸部腫瘍；白血病およびリンパ系悪性腫瘍が含まれる。本抗体、結合フラグメントまたは複合体で有効に治療され得る腫瘍細胞は、本抗体と結合する細胞として認識することができる。特定の実施態様では、癌細胞は、卵巣癌細胞およびリンパ系癌細胞を含むミスフォールドPrP提示癌細胞である。

50

【 0 1 0 1 】

本抗体、フラグメントまたは複合体で治療可能な卵巢癌のタイプとしては、それらが形成された細胞の種類に従って3つの主要なカテゴリー内にあるもの、すなわち、(1) 卵巢を裏打ちまたは被覆する細胞から生じる上皮腫瘍；(2) 卵巢内で卵を形成することが運命付けられている細胞に起源する生殖細胞腫瘍；および(3) とともに卵巢を保持し、女性ホルモンを産生する結合細胞で始まる性索間質細胞腫瘍が含まれる。また、卵巢外腹膜癌（腹腔内癌症）などの卵巢組織に隣接する腫瘍も含まれる。

【 0 1 0 2 】

一般上皮腫瘍(common epithelial tumors)は卵巢の表面上皮で始まり、全卵巢癌の約90%を占める。それらは漿液性腫瘍、類内膜腫瘍、粘液性腫瘍、および明細胞腫瘍を含むいくつかのサブタイプに分けられ、これはさらに良性（非癌性）腫瘍または悪性（癌性）腫瘍に分類することができる。漿液性腫瘍は、卵巢癌の最も蔓延している形態である。漿液性腫瘍は、一般上皮腫瘍の40%を占める。これらの腫瘍の約50%が悪性であり、33%が良性であり、17%が境界悪性である。漿液性腫瘍は40歳～60歳の間の女性に最も多く見られる。類内膜腫瘍は、一般上皮腫瘍のおよそ20%に相当する。約20%の個体では、これらの癌は子宮内膜癌（子宮の内膜の癌）に関連している。症例の5%では、それらは骨盤腔内に子宮内膜（子宮の裏打ち組織）が異常に出現する子宮内膜症にも関連している。これらの腫瘍の約80%は悪性であり、残りは通常、境界悪性である。類内膜腫瘍は主に50歳～70歳の女性に見られる。粘液性腫瘍は、総ての一般上皮腫瘍の約1%を占める。これらの腫瘍のほとんど（およそ80%）は良性であり、15%が境界悪性であり、わずかに5%が悪性である。粘液性腫瘍は、30歳～50歳の間の女性に最も多く現れる。明細胞腫瘍は、一般上皮腫瘍の約6%を占める。これらの腫瘍のほとんど総てが悪性である。総ての明細胞腫瘍のおよそ2分の1が子宮内膜症に関連している。明細胞腫瘍を有するほとんどの患者は40歳～80歳の間である。

【 0 1 0 3 】

また、ブレンナー腫瘍、未分化腫瘍、および移行細胞腫瘍、ならびに卵巢内で卵を生成している細胞から形成される生殖細胞腫瘍などの希なタイプの卵巢腫瘍も本抗体、フラグメントまたは複合体で治療可能である。

【 0 1 0 4 】

本抗体、ならびにその結合フラグメントおよび複合体は、特に、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)を含むプリオン疾患の治療および検出にも有用である。それに結合した際に凝集したPrPのクリアランスを指示する抗体が特によく適合している。このような抗体には、マクロファージにより認識されるものが含まれる。この目的に効果的な用量サイズおよび投与計画は、ミスフォールドPrPに選択的に結合する任意の薬剤を用いる全身イメージングまたは*in vitro*スクリーニングなどの、そこで有用な任意の方法で判定した場合にPrP凝集物の存在を減らすものである。

【 0 1 0 5 】

抗癌剤として使用する場合、適当な用量は、上記で定義されるような治療される特定のタイプの疾患、疾患の重篤度および経過、薬剤が予防目的で投与されるか治療目的で投与されるか、過去の療法、患者の臨床歴および薬剤に対する応答、ならびに担当の医師の裁量によって異なる。薬剤は患者に1回でまたは一連の処置で適宜投与される。

【 0 1 0 6 】

例えば、疾患のタイプおよび重篤度によって、例えば、1回以上の分離した投与によるものであれ、または持続的注入によるものであれ、約1 μ g / kg ~ 15 mg / kg（例えば、0.1 ~ 20 mg / kg）の抗体または複合体が患者への投与のための候補用量となる。典型的な一日量は、上述の因子に応じて、約1 μ g / kg ~ 100 mg / kgの範囲内またはそれを超えるものである。病態に応じて、数日またはそれより長期にわたる反復投与の場合、処置は疾患症状の所望の抑制が見られるまで持続される。しかしながら、他の投与計画が有用である場合もある。単位用量は、例えば、約5 mg ~ 500 mgの範囲、例えば、50 mg、100 mg、150 mg、200 mg、250 mg および300

10

20

30

40

50

mg であり得る。抗癌療法の進行は、従来の技術およびアッセイによってモニタリングされる。

【0107】

実施態様において、本抗体は、開始用量 4 mg / kg で 90 分、次いで 2 mg / kg で 30 分、1 週間に 1 回 5 2 週間などの静注によって投与することができ、必要に応じて追加治療を行う。

【0108】

ウレアーゼに基づく免疫複合体が使用される場合、ミスフォールド PrP⁺ である癌細胞を含む標的細胞の治療に付加的指針が利用できる。上記に述べたように、ウレアーゼは尿素の加水分解を触媒して、カルバミン酸塩とアンモニアを産生する。水性環境中で、カルバミン酸塩は急速かつ自発的に分解して、2 分子のアンモニアと 1 分子の二酸化炭素を生じる。ウレアーゼは多様の機能を有する。その主要な環境上の役割は、生物体に外的な、および内的に生成された尿素を窒素源として使わせることである。植物では、ウレアーゼは、全身の窒素輸送経路に加わり、毒素防護タンパク質として働く可能性がある。

【0109】

ウレアーゼの基質は尿素であり、尿素は肝臓で産生され、血流で腎臓に運ばれ、尿に排泄される。健康なヒトの尿素の血清濃度は一般に 1 ~ 10 mM の間であるが、尿中の尿素レベルは 0.5 M を超えることがある (Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Merck and Co., Inc., Rahway, N.J., 1999)。尿素はまた主要および非主要外分泌腺の分泌物中にも血清と同等の濃度で存在するので、循環尿素の大きな割合が分泌系により細胞表面に、または組織浸出物中に移行される (Burne, R. A., and Chen, Y. M., *Microbes and Infection*, 2, 2000; 533-542)。例えば、成人は 1 ~ 10 mM の尿素を含有する唾液を 1 日あたりほぼ 1 リットル分泌し、生産される全尿素のおよそ 20 ~ 25 % が、身体から尿に出て行くのではなく腸管に入る (Vissek, W. J., *Fed. Proc.* 31 (1972) 1178-1193)。尿素の外分泌に明らかな能動的流出機構は無く、従って、電荷のない尿素分子は細胞および上皮の密着結合を通して単に水に随行すると考えられる。結果として、ヒト身体の細胞の表面は、尿素を含有する体液に浸かっている (McLean R. J. C., et al. *CRC, Crit. Rev. Microbiol.* 16 (1988) 37-79)。

【0110】

ウレアーゼに基づく免疫複合体に関して、投与の時機および順序を規定する効果的ないずれの投与計画も使用可能である。ヒト被験体のための例示的用量レベルは、投与様式、腫瘍の程度 (サイズおよび分布)、患者のサイズ、およびウレアーゼ処置に対する癌の応答性によって異なる。

【0111】

ウレアーゼ組成物が腫瘍に直接注射される場合には、例示的用量は、腫瘍 1 mm³ 当たり 0.1 ~ 1,000 国際単位のウレアーゼ活性である。例えば、腫瘍中でウレアーゼの比較的均一な分布が達成されるとすると、0.5 ~ 5 国際単位の間の用量が好適であり得る。注射針の位置は従来のイメージガイダンス技術、例えば、蛍光透視法によってガイドすることができるので、医師は標的組織に対する針の位置を視認することができる。このようなガイダンスツールは、超音波、蛍光透視法、CT または MRI を含むことができる。

【0112】

投与されたウレアーゼ複合体用量の有効性または分布は、ウレアーゼの腫瘍への直接注射中または注射後に、被験体の癌性組織領域内の pH の変化を検出することができるツールにより腫瘍組織をモニタリングすることによってモニタリングすることができる。このようなツールとしては、腫瘍に直接挿入することができる pH プロブ、または磁気共鳴イメージング (MRI)、コンピューター断層撮影法 (CT)、または蛍光透視法などの可視化ツールを含み得る。MRI 検査は、付加的なイメージング剤の不在下で、単に、pH の関数としての組織の磁気特性の違いに基づいて行うことができる。CT または蛍光透視イメージングは、その陰影が組織媒体の pH によって影響を受ける付加的な pH 感受性

イメージング剤を必要とする場合がある。このような薬剤は当業者に周知である。

【0113】

ウレアーゼ複合体注射の前に、腫瘍組織を、周囲の正常組織に比べてその低いpHによって可視化することができる。よって、正常組織は約7.2の正常pHを持ち得るが、腫瘍組織は0.1~0.4またはそれを超えるpH単位だけ低いものであり得る。すなわち、ウレアーゼが注射される前には、腫瘍組織の範囲はその低いpHにより画定することができる。ウレアーゼ複合体の投与後、ウレアーゼを含む腫瘍領域のpHは上昇し始め、結果として得られた画像と最初の投与前画像を比較することにより識別することができる。

【0114】

この様式で組織を検査することにより、pH変化の程度および罹患組織の範囲をモニタリングすることができる。この検査に基づき、医師はその部位に追加の組成物を投与することができ、かつ/またはその腫瘍部位内のさらなる領域に組成物を投与することができる。この手順を、例えば0.2~0.4pH単位などの所望のpH変化の程度が固形腫瘍の全領域に達成されるまで繰り返せばよい。

【0115】

直接注射による投与は、例えば、毎週または週に2回などの好適な間隔で、所望のエンドポイント、好ましくは、腫瘍塊の実質的または完全な退縮が見られるまで繰り返すことができる。治療有効性は上記のように、治療経過中に処置された組織のpH変化を可視化することによってモニタリングすることができる。よって、各追加注射の前に組織のpHを可視化してその時の腫瘍の存在程度を決定することができ、その後、組織のpH変化を用いて、組織への新規用量のウレアーゼ組成物の投与をモニタリングすることができる。

【0116】

ウレアーゼ複合体が直接注射以外の方法によって非経口投与される場合、ウレアーゼの例示的用量は、100~100,000国際単位/kgウレアーゼ活性/kg被験体体重である。

【0117】

上記のように、組織pHの変化に感受性のあるイメージング技術は、投与用量の有効性をモニタリングするために使用可能である。このような標的化には数時間かまたはそれより長くかかり得るので、この方法は、上記のように、ウレアーゼ複合体注射の前と、投与後の数時間、例えば、12~24時間、腫瘍pHをモニタリングして、腫瘍領域のpHの上昇を証拠とする、腫瘍部位に十分な用量が施されていることを確認することを含み得る。この検査の結果に応じて、本方法は、所望のpH上昇、例えば、0.2~0.4pH単位の上昇が見られるまで、追加投与を指示することができる。ひと度この用量が確立されれば、患者は同様の用量のウレアーゼ組成物で、定期的に、例えば、週に1回または2回、腫瘍サイズまたは病態の変化が達成されるまで処置することができる。

【0118】

投与頻度は、薬剤の薬物動態パラメーターおよび投与経路によって異なる。用量および投与は、十分なレベルの活性薬剤を提供するため、または所望の効果を維持するために調整される。よって、本医薬組成物は、所望の最小レベルの薬剤を維持するために必要に応じて単回用量、複数回の別個の用量、持続的注入、徐放性デポ、またはそれらの組合せで投与することができる。

【0119】

医薬組合せ

本抗体、または結合フラグメントもしくは複合体は、それを必要とする被験体に、有用な他の薬剤と組み合わせて投与することができる。1以上のさらなる治療薬と「組み合わせて」投与するとは、同時(共)投与および任意の順序での連続投与を含む。他の治療計画を本発明の抗癌剤、例えば、抗体または複合体の投与と組み合わせてもよい。例えば、このような抗癌剤で治療される患者は、外部照射療法などの放射線療法もまた受けてよい。代わりに、または加えて、化学療法薬を患者に投与してもよい。このような化学療法薬の調製および投与計画は、製造者の説明書に従うか、または熟練の医師によって経験的に

10

20

30

40

50

決定されるように使用することができる。このような化学療法薬の調製および投与計画はまた、Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992)にも記載されている。化学療法薬は、例えば抗体などの抗腫瘍薬剤の投与(administration or the anti-tumor agent)に先行または後続してよく、あるいはそれと同時に投与されてもよい。本抗体は、複合体に関して上記された毒素のうちいずれと組み合わせてもよく、または任意の他の好適な薬物としては特に、イリノテカン(CPT-11)、シスプラチン、シクロホスファミド、メルファラン、ダカルバジン、ドキシソルピシン、ダウノルビシン、およびトポテカン、ならびにチロシンキナーゼ阻害剤が含まれる。

【0120】

特に卵巣癌の治療に使用するためには、本抗体、結合フラグメントまたは免疫複合体は、パクリタキセルおよび/もしくはカルボプラチンなどのタキサン、または卵巣癌治療のために使用中の任意の他の薬物と組み合わせ投与することができる。

10

【0121】

また、他の腫瘍関連抗原またはそれらのリガンドに対する抗体または複合体、例えば、本抗体により標的とされるものと同じタイプの罹患細胞も標的とする抗体または薬剤を投与することが望ましい場合もある。よって、本抗体は通常、特に白血病およびリンパ腫を含む液性腫瘍、ならびに卵巣組織腫瘍を含む固形腫瘍の治療のために使用中の薬剤と組み合わせ投与される。

【0122】

よって、実施態様において、本抗体、結合そのフラグメントまたはそれに基づく免疫複合体は、本抗体の結合を増強する化学療法薬と組み合わせ使用することができる。例えば、パクリタキセルとともにインキュベートされた卵巣癌細胞は抗体結合の増強を示すことが確認されている。よって、一つの実施態様では、本発明は、ミスフォールドPrP表現型を有するものを含む卵巣癌を呈する被験体がまずパクリタキセルで処置され、その後、本発明の抗体、フラグメントまたは免疫複合体で処置される治療方法を含んでなる。あるいは、被験体は、これらの薬物を同時に受容することもできる。抗体結合の増強も引き起こす他の抗癌剤は、本明細書で例示される同じ*in vitro*法を用いて特定することができる。例えば、パクリタキセル以外のタキサン、例えばタキソールが同様に有用であると予想される。

20

【0123】

本方法では、ウレアーゼに基づく免疫複合体は、例えば、固形腫瘍に、ウレアーゼが腫瘍流体の細胞外pHを少なくとも0.1pH単位、例えば、0.1~0.5pH単位またはそれを超えて上昇させるために有効な量で投与される。特定の実施態様では、流体の細胞外pHは、少なくともpH7.0、7.2、またはそれより高く上昇される。

30

【0124】

ウレアーゼ複合体は、被験体の腫瘍に直接、または直接注射以外の非経口的に投与することができる。また、上記のように、ウレアーゼ複合体の投与によりもたらされたpH変化は、腫瘍組織のpH変化およびそれらの変化の程度を、腫瘍pHを可視化するためのイメージングツールを用いて、または腫瘍の直接pH測定により決定することによってモニタリングすることができる。

40

【0125】

キット

本発明の別の実施態様では、本明細書に記載の障害の診断または治療に有用な材料を含む製品が提供される。この製品は、本抗体、またはその結合フラグメントもしくは免疫複合体を、容器内に、かつ好適には標識を担持して含んでなる。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、および試験管が含まれる。これらの容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成されてよい。容器は病態を検出または治療するために有効な組成物を保持し、無菌アクセスポートを持ち得る(例えば、容器は、皮下注射針により貫通可能なストッパーを備えた静脈内溶液バッグまたはバイアルであり得る)。容器上の、または容器に付随するラベルは、組成物が癌病態を治療するためまた

50

はCJDなどの伝達性海綿状脳症を治療するために使用されることを示す。本製品は、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液およびデキストロース溶液などの薬学的に許容可能なバッファーを含んでなる(compromising)第2の容器をさらに含んでなって(compromise)よい。本製品はさらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、および本発明に従った使用説明を記した添付文書を含め、商業上および使用上の観点から望ましい他の物品を含んでもよい。PrP調製標品など、本方法において有用な対照薬剤または標品も本キットに含むことができる。

【0126】

示した通り、本明細書に記載の抗体は、被験体におけるプリオンミスフォールディング関連疾患または障害の治療、予防または改善のための医薬組成物において使用され得る。このような病態としては特に、CJDなどのヒトを侵す伝達性海綿状脳症が含まれる。本発明のいくつかの実施態様による治療上有効な量の抗体と薬学的に許容可能な賦形剤とを含んでなる医薬組成物は、プリオンミスフォールディング関連疾患または障害を治療するために被験体に投与することができる。本抗体はPrPSc凝集物の形成を阻害し得るか、またはPrPCからPrPScアイソフォームへのさらなる変換を遮断し得る。本医薬組成物は、例えば、PrPSc形成および/または凝集の神経毒性作用の軽減に有用であり得る。本医薬組成物は、血液脳関門の透過性を増強する添加剤または薬剤をさらに含んでなり得る(血中への投与のため)。別法として、本組成物は、脳脊髄液中に直接投与することができる。疾患の進行は、本抗体をイメージング剤との複合体として投与し、それにより、以下でさらに述べるようにPrP凝集の位置および/または程度を明らかにすることによってモニタリングすることができる。

【0127】

本抗体は、当然のことながら、被験体が本PrP抗体に対して免疫反応性を保持するミスフォールド型でPrPを産生する限り、ヒトだけでなく家畜およびペットを含む哺乳類を含め、本方法から利益を受け得るあらゆる被験体を治療するために使用することができると考えられる。

【0128】

検出および診断

標的エピトープに選択的に結合する抗体およびそのフラグメントは、本発明の態様に従って、癌または他の細胞をスクリーニングしてミスフォールドPrPを提示するものを検出するために使用される。好ましい実施態様では、スクリーニングは、PrP抗体療法の候補である被験体から採取した癌細胞のサンプルに適用される。ミスフォールド型のPrPを提示する癌細胞に関して陽性判定の被験体は、次に、本抗体、またはそのフラグメントもしくは免疫複合体による療法の予定を組むことができる。本明細書に記載の抗体または他の結合剤と組み合わせた標準的な技術を癌細胞のスクリーニングに使用することができる。望ましくは、本抗体に検出可能な標識を組み込む。この標識はそれ自体検出可能であり得(例えば、放射性同元素標識または蛍光標識)または酵素標識の場合には、検出可能な基質化合物または組成物の化学変化を触媒し得る。検出可能な標識として機能し得る放射性核種としては、例えば、I-131、I-123、I-125、Y-90、Re-188、Re-186、At-211、Cu-67、Bi-212、およびPd-109が含まれる。

【0129】

ミスフォールドPrPを有する癌細胞への結合の*in situ*検出もまた、本抗体またはフラグメントを用い、免疫蛍光または免疫電子顕微鏡によって行うことができる。この目的で、患者から組織学的検体を取り出し、標識形態の本抗体をそれに適用する(好ましくは、標準的な免疫組織化学技術に合わせて生体サンプル上に抗体を載せることによる)。また、この手順により、生検腫瘍組織内でPrP抗原の分布が検討でき、PrPがミスフォールド型で提示される部位のみを明らかにすることができる。多様な組織学的方法が*in situ*検出に容易に利用できることは当業者にとって自明である。

【0130】

10

20

30

40

50

より詳しくは、本発明のミスフォールドPrP抗体または結合フラグメントは、例えば、脳、皮膚、肝臓、心臓、腎臓、膵臓、腸、脾臓、筋肉、脂肪、皮膚、卵巣などからの組織生検、細胞由来、または脳脊髄液、血液などの体液（血漿、尿、精液を含む）由来などの生体サンプルにおいて抗体反応性の有無を、標準的な検出アッセイを用いてモニタリングするために使用可能である。免疫アッセイは直接検出を含んでよく、大量のサンプルを、ミスフォールドPrPを提示する癌細胞の存在に関してスクリーニングするために特に適している。例えば、抗体は、複合体の形成を測定するために任意の標準的なイムノアッセイ形式（例えば、ELISA、ウエスタンブロット、免疫沈降、フローサイトメトリーまたはRIAアッセイ）で使用することができる。限定されるものではないが、任意の放射活性、蛍光、発色（例えば、アルカリ性ホスファターゼもしくはセイヨウワサビペルオキシダーゼ）、または化学発光標識、または標識されたハプテン特異的抗体または他の結合パートナー（例えば、アビジン）を用いて可視化され得るハプテン（例えば、ジゴキシゲニンもしくはビオチン）を含む、直接または間接的に可視化され得る適当な標識がこれらの検出アッセイにおいて使用可能である。例示的イムノアッセイは、例えば、Ausubel et al., 前掲, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Approach*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988)、およびMoynagh and Schimmel, *Nature* 400:105, 1999に記載されている。例えば、本明細書に記載の抗体を用いる場合、ミスフォールドPrPは、標準的なフローサイトメトリー法を用いて細胞表面で容易に検出される。適当な対照サンプルと比較して標識複合体を含有することが判明したサンプルはミスフォールドPrPの存在を示すと考えられ、従って、癌または本抗体による治療に従う他の疾患の指標となる。

10

20

【0131】

ウレアーゼに基づく複合体が使用される場合、被験体は、上記のように、被験体の組織の細胞外pHの変化を検出することができる診断ツールを用いて検査することができる。診断ツールは好ましくは、活性薬剤の前、後、または同時に投与され得る、腫瘍に局在し得る上記のようなイメージング試薬、造影試薬またはシフト試薬などのpH感受性診断薬である。投与後に細胞外pHの上昇を示す組織領域が被験体内で同定される。上記のようなMRI、PETスキャンなど、診断薬を同定し得るいずれのツールもこの薬剤の検出に使用可能である。

【0132】

一つの実施態様では、本方法は、ウレアーゼ複合体を抗腫瘍療法が行われる被験体に投与することを含み、上記の同定は固形腫瘍におけるウレアーゼの局在を検出するために使用される。この同定はウレアーゼ複合体投与に応答した腫瘍のサイズおよび形状の変化をモニタリングするために使用可能である。

30

【0133】

PETスキャンを使用する一つの実施態様では、被験体は¹³N標識アンモニアを投与される。次に、患者は、ウレアーゼ複合体を腫瘍部位に到達するために有効な量で投与される。ウレアーゼは尿素を加水分解して非標識アンモニアを生成する。経時的に、標識アンモニアは希釈されまたは置き換わり、スキャンで段階的な消失を生じる。PETスキャンを使用する別の実施態様では、被験体は¹³N標識尿素を投与される。次に、患者はウレアーゼ複合体を腫瘍部位に到達するために有効な量で投与される。ウレアーゼは標識尿素を加水分解して標識アンモニアを生じ、これをスキャンで検出することができる。

40

【0134】

本抗体は、本明細書で例示されるように、好適には組換えDNA手段によって生産される。生産のため、本抗体の重鎖をコードするDNA分子、およびその軽鎖をコードするDNA分子が提供される。このDNAはさらに、所望の抗体を分泌型の二量体化されプロセッシングされたタンパク質として精密化するためにフォールディングとジスルフィド形成を伴って適正なエクスターナリゼーションを可能とする、分泌鎖前駆体の発現に好適な任意のシグナルペプチドをコードする。この目的で、本発明は、一つの実施態様において、配列番号7で示される、好ましい抗体の軽鎖可変領域をコードする配列を含んでなるポリヌ

50

クレオチドを提供する。また、別の実施態様では、配列番号 8 で示される、好ましい抗体の重鎖可変領域をコードする配列を含んでなるポリヌクレオチドである。

【 0 1 3 5 】

より具体的な実施態様において、本発明は、下記に列挙される通り、これまでのところ好ましい抗体の全長軽鎖（配列番号 9）をコードするポリヌクレオチドおよび全長重鎖（配列番号 10）をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【 0 1 3 6 】

重鎖

5'末端にHindIIIおよび3'末端にNotIを有するDNAフラグメント

【化6】

10

```

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTGAGTCCGGTGGAGGAG
TCCGGGGGTACCTGGTACAGCCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGAATCGACCTCAGT
ACCTATGCAATGGGCTGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGAGTCATTAATAAAAGT
GGTAACACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCGCCATCTCCAAAACCTCGACCACGGTGGATCTA
AAGATCACCACTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGGCAGATATGGTATTGGTGTTCCTTAC
TATGACATCTGGGCCCCAGGCACCTGGTACCCGTCCTCA
GGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCACTGGCCCCCTGCTGCGGGACACACCCAGCTCCACGGTGACC
CTGGGCTGCCTGGTCAAAGGGTACCTCCCGGAGCCAGTGACCGTGACCTGGAACCTCGGGCACCCCTCACCAAT
GGGTACGCACCTTCCCGTCCGTCGGCAGTCTCAGGCCTCTACTCGCTGAGCAGCGTGGTGGAGCGTGACC
TCAAGCAGCCAGCCGTCACCTGCAACGTGGCCCCACCCAGCCACCAACACCAAAGTGGACAAGACCGTTGCG
CCCTCGACATGCAGCAAGCCACGTGCCACCCCTGAACTCCTGGGGGACCGTCTGTCTTCATCTTCCCC
CCAAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCACGCACCCCGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAG
GATGACCCCGAGGTGCAGTTCACATGGTACATAAAACAACGAGCAGGTGCGCACCCGCGCCCGCTACGG
GAGCAGCAGTTC AACAGCAGCATCCGCGTGGTGCAGCACCCCTCCCCATCGCGCACCCAGGACTGGCTGAGGGC
AAGGAGTTCAAGTGCAAAGTCCACAACAAGGCACCTCCCGGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAGA
GGGCGACCCCTGGAGCCGAAGGTCTACACCATGGGCCCCCTCCCGGGAGGAGCTGAGCAGCAGGTCCGGTGCAGC
CTGACCTGCATGATCAACGGCTTCTACCTTCCGACATCTCGGTGGAGTGGGAGAAGAACGGGAAGGCAGAG
GACAACCTACAAGACCACCGCCGCGTGTGGACAGCGACGGCTCCTACTTCCCTCTACAGCAAGCTCTCAGTG
CCCACGAGTGGAGTGGCAGCGGGGCGACGTCTTCACCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCTTGCAACCACTAC
ACGCAGAAAGTCCATCTCCCGCTCTCCGGTAAATGA [配列番号 11]

```

20

【 0 1 3 7 】

軽鎖：

5'末端にHindIIIおよび3'末端にNotIを有するDNAフラグメント

30

【化7】

```

ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCACATTTGCCCAA
GTGCTGACCCAGACTCCATCCCCCTGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCACAGTACCATCAATTGCCAGTCCAGT
CAGAGTCTTTATAATAAGAACTGGTTATCCTGGTATCAGAAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAAGCTCCTGATC
TACAAGGCATCCACTCTGGAATCTGGGGTCTCATCGCGTTCAAGGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACT
CTCACCATCAGCGGCGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCAAGGCGAATTTAGTTGTAGTAGT
GCTGATTGTACGGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAA
GGTGTATCCAGTTGCACCTACTGTCTCTACTTCCACCAGCTGCTGATCAGGTGGCAACTGGAACAGTCAAC
ATCGTGTGTGGCGAATAAAATACTTTCCCGATGTCACCGTCACCTGGGAGGTGGATGGCACCACCCAAACA
ACTGGCATCGAGAACAGTAAAACACCGCAGAAATCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTGACA
CTGACCAGCACACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACCTGCAAGGTGACCCAGGGCACGACCTCAGTCGTC
CAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTTAC [配列番号 12]

```

40

【 0 1 3 8 】

示されている配列内で同義コドンが置換されているポリヌクレオチド等価物も本抗体を生産するために使用可能であると考えられる。

【 0 1 3 9 】

実施態様において、重鎖またはその可変領域をコードするポリヌクレオチドおよび軽鎖またはその可変領域をコードするポリヌクレオチドを含んでなるベクターもまた提供される。抗体を発現させるために、ポリヌクレオチドは発現ベクター内に機能的に組み込まれる、すなわち、転写制御配列および翻訳制御配列に機能的に連結される。発現ベクターとしては、プラスミド、レトロウイルス、コスミドなどが含まれる。発現ベクターおよび発

50

現制御配列は、使用する発現宿主細胞と適合するように選択される。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子は、別個のベクターに挿入することができる。好ましい実施態様では、両遺伝子は同じ発現ベクターに挿入される。これらの抗体遺伝子は標準的な方法（例えば、抗体遺伝子フラグメントとベクター上の相補的制限部位の連結、または制限部位が存在しない場合には平滑末端連結）により発現ベクターに挿入される。

【0140】

好都合なベクターは、機能的に完全なヒトC HまたはC L免疫グロブリン配列を、任意のV HまたはV L配列が上記のように容易に挿入および発現できるように操作された適当な制限部位とともにコードするものである。このようなベクターでは、スプライシングは通常、挿入されたJ領域内のスプライス供与部位とヒトC領域の前にあるスプライス受容部位との間で、またヒトC Hエキソン内に存在するスプライス領域においても起こる。ポリアデニル化および転写終結は、これらのコード領域の下流にある天然染色体部位に存在する。組換え発現ベクターはまた、宿主細胞から抗体鎖の分泌を促すシグナルペプチドをコードすることもできる。抗体鎖遺伝子は、シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレームで連結されるようにベクターにクローニングすることができる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種シグナルペプチド（すなわち、非免疫グロブリンタンパク質に由来するシグナルペプチド）であり得る。

10

【0141】

重鎖および/または軽鎖をコードするポリヌクレオチド、およびこれらを含んでなるベクターは、好適な哺乳類宿主細胞の形質転換に使用することができる。異種ポリヌクレオチドを哺乳類細胞に導入するための方法は、デキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿法、ポリブレン媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リポソーム中へのポリヌクレオチドの封入、微粒子銃注入および核へのDNAの直接マイクロインジェクションが含まれる。さらに、ポリヌクレオチドは、ウイルスベクターによって哺乳類細胞へ導入してもよい。

20

【0142】

抗体コードポリヌクレオチドの発現用の宿主として有用な哺乳類細胞株としては、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）から入手可能な多くの不死化細胞株が含まれる。これらには、とりわけ、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、NSO、SP2細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞、サル腎臓細胞（COS）、ヒト肝細胞癌細胞（例えば、HepG2）、A549細胞、3T3細胞、およびいくつかの他の細胞株が含まれる。特定の実施態様では、ポリヌクレオチドをHEK293宿主で発現させる。哺乳類宿主細胞としては、ヒト、マウス、ラット、イヌ、サル、ピッグ、ヤギ、ウシ、ウマ、およびハムスター細胞が含まれる。特に好ましい細胞株は、どの細胞株が高い発現レベルを有するかを決定することによって選択される。使用可能な他の細胞株としては、S19細胞などの昆虫細胞株、両生類細胞、細菌細胞、植物細胞および真菌細胞がある。重鎖またはその抗原結合部分をコードする組換え発現ベクターを哺乳類宿主細胞に導入する場合、抗体は、宿主細胞を、宿主細胞内でその抗体の発現、またはより好ましくは、宿主細胞が増殖している培養培地中への抗体の分泌を可能とするのに十分な時間培養することによって生産される。抗体は、標準的なタンパク質精製法を用いて培養培地から回収することができる。

30

40

【0143】

本発明の抗体はヒトモノクローナル抗体として得ることができる。このようなヒトモノクローナル抗体は、マウス系ではなくヒト免疫系の部分を有するトランスジェニックマウスまたは染色体導入マウスを用いて作製することができる。これらのトランスジェニックマウスおよび染色体導入マウスとしては、本明細書においてそれぞれHuMAbマウス（登録商標）およびKMマウス（登録商標）と呼ばれるマウスが含まれ、本明細書では「ヒトIgマウス」と総称する。

【0144】

HuMAbマウス（登録商標）（Medarex（登録商標），Inc.）は、非再配

50

列ヒト重鎖（ μ および δ ）ならびに軽鎖免疫グロブリン配列を、内因性の μ および δ 鎖遺伝子座を不活性化する標的化突然変異とともにコードする、ヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座を含む（例えば、Lonberg et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859参照）。よって、マウスは、マウスIgMまたは δ 鎖の低下を示し、免疫誘導に応答して、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子は、クラス転換と体細胞突然変異を受け、高親和性ヒトIgGモノクローナル抗体を生成する（Lonberg et al. (1994), 前掲; Lonberg (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93、およびHarding and Lonberg (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546で総説）。HuMAbマウス（登録商標）の作製および使用、ならびにこのようなマウスが有するゲノム修飾は、Taylor et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen et al. (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuailon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724; Choi et al. (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuailon et al. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor et al. (1994) International Immunology 6: 579-591;およびFishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851に記載されており、これらの総ての内容は引用することによりその総てが具体的に本明細書の一部とされる。さらに、米国特許第5,545,806号;同第5,569,825号;同第5,625,126号;同第5,633,425号;同第5,789,650号;同第5,877,397号;同第5,661,016号;同第5,814,318号;同第5,874,299号;同第5,770,429号;および同第5,545,807号;PCT公開WO92/03918;WO93/12227;WO94/25585;WO97/13852;WO98/24884;WO99/45962およびWO01/14424も参照、これらの内容は引用することによりその総てが本明細書の一部とされる。

【0145】

別の実施態様では、ヒト抗体は、導入遺伝子および導入染色体上にヒト免疫グロブリン配列を有するマウス、例えば、ヒト重鎖導入遺伝子とヒト軽鎖導入染色体を有するマウスを用いて作製される。このマウスは本明細書において「KMマウス（登録商標）」と呼ばれ、PCT公開WO02/43478に詳細に記載されている。内因性FcRIIB受容体遺伝子の同型接合性破壊をさらに含んでなる、このマウスの改変型もPCT公開WO02/43478に記載されており、本明細書では「KM/FCGR2Dマウス（登録商標）」と呼ばれる。さらに、Hco7もしくはHco12重鎖導入遺伝子のいずれかまたはその両方を有するマウスも使用可能である。

【0146】

さらなるトランスジェニック動物の具体例としては、ゼノマウス(Xenomouse) (Abgenix, Inc.、米国特許第5,939,598号;同第6,075,181号;同第6,114,598号;同第6,150,584号および同第6,162,963号)。さらなる具体例としては、「TCマウス」(Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727)およびヒト重鎖と軽鎖導入染色体を有するウシ(Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894;PCT公開WO02/092812)が含まれる。これらの特許および公報の内容は、引用することによりその全内容が具体的に本明細書の一部とされる。

【0147】

ヒトモノクローナル抗体はまた、免疫誘導時にヒト抗体応答が生じ得るようにヒト免疫細胞が再構成されているSCIDマウスを用いて作製することもできる。例えば、米国特許第5,476,996号および同第5,698,767号参照、これらの内容は引用することによりその全内容が本明細書の一部とされる。

【0148】

本発明の抗体はまた、例えば、当技術分野で周知のような組換えDNA技術と遺伝子トランスフェクション法の組合せ（例えば、Morrison, S. (1985) Science 229:1202）を用

10

20

30

40

50

いて、宿主細胞トランスフェクターマにおいて生産することもできる。一つの実施態様では、標準的な分子生物学的技術によって得られた部分的または全長軽鎖および重鎖をコードするDNAを、それらの遺伝子が転写および翻訳調節配列に機能的に連結されるように、1以上の発現ベクターに挿入する。この文脈で、用語「機能的に連結される」とは、抗体遺伝子が、ベクター内の転写および翻訳制御配列が抗体遺伝子の転写および翻訳を調節するというそれらの意図される機能を果たすようにベクターに連結されることを意味するものとする。

【0149】

用語「調節配列」は、抗体鎖遺伝子の転写または翻訳を制御するプロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むものとする。このような調節配列は、例えば、Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990))に記載されている。哺乳類宿主細胞発現のための好ましい調節配列としては、哺乳類細胞で高レベルのタンパク質発現を指示するウイルスエレメント、例えば、サイトメガロウイルス(CMV)、シミアンウイルス40(SV40)、アデノウイルス、（例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター(AdMLP)およびポリオーマに由来するプロモーターおよび/またはエンハンサーが含まれる。あるいは、ユビキチンプロモーターまたは - グロビンプロモーターなどの非ウイルス性調節配列も使用可能である。なおさらに、調節エレメントは、SRプロモーター系など、SV40初期プロモーター由来の配列およびヒト1型T細胞白血病ウイルスの長い末端反復配列を含有する種々の供給源由来の配列から構成される(Takebe et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472)。発現ベクターおよび発現制御配列は、使用する発現宿主細胞に適合するように選択される。

【0150】

抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子は、同一または別個の発現ベクターに挿入することができる。好ましい実施態様では、可変領域を用い、任意の抗体アイソタイプの全長抗体遺伝子を作成する（前記遺伝子を所望のアイソタイプの重鎖定常領域と軽鎖定常領域をすでにコードしている発現ベクターに挿入することによる、この場合、VHセグメントが前記ベクター内のCHセグメントに機能的に連結され、VLセグメントが前記ベクター内のCLセグメントに機能的に連結されるようにする）。それに加えて、またはその代わりに、組換え発現ベクターは、宿主細胞から抗体鎖の分泌を促すシグナルペプチドをコードすることができる。抗体鎖遺伝子は、シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレームで連結されるように、ベクターにクローニングすることができる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種シグナルペプチド（すなわち、非免疫グロブリンタンパク質に由来するシグナルペプチド）であり得る。

【0151】

抗体鎖遺伝子および調節配列に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞内のベクターの複製を調節する配列（例えば、複製起点）および選択マーカー遺伝子などの付加的配列を有し得る。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択を容易にする（例えば、米国特許第4,399,216号；同第4,634,665号および同第5,179,017号参照）。例えば、一般に、選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞にG418、ハイグロマイシンまたはメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を付与する。好ましい選択マーカー遺伝子としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)遺伝子（メトトレキサート選択/増幅とともにdhfr-宿主細胞で使用する場合）およびneo遺伝子（G418選択の場合）が含まれる。

【0152】

軽鎖および重鎖の発現のためには、重鎖および軽鎖をコードする発現ベクターを、標準的な技術により宿主細胞にトランスフェクトする。用語「トランスフェクション」の様々な形態は、原核生物または真核生物宿主細胞に外来DNAを導入するために慣用される広範な技術、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラントランスフェクションなどを包含するものとする。原核生物宿主細胞または真核生

10

20

30

40

50

物宿主細胞のいずれにおいても本発明の抗体を発現させることは理論上可能であるが、真核細胞、最も好ましくは、哺乳類宿主細胞での抗体の発現が最も好ましく、これは哺乳類細胞が原核細胞よりも、適正にフォールディングされ、免疫学的に活性な抗体を構築して分泌する可能性が高いからである。

【0153】

本発明の組換え抗体を発現するために好ましい哺乳類宿主細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣（CHO細胞）（Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U SA 77:4216-4220に記載されている dhfr - CHO細胞を含む、例えばR. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) J. Mol. Biol. 159:601-621に記載されているようにDHFR選択マーカーとともに使用）、NSO骨髄腫細胞、COS細胞、HEK293細胞およびSP2細胞が含まれる。特に、NSO骨髄腫細胞とともに使用する場合、別の好ましい発現系として、WO87/04462、WO89/01036およびEP338,841に開示されているGS遺伝子発現系がある。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳類宿主細胞に導入する場合、抗体は、宿主細胞を、宿主細胞内での抗体の発現、またはより好ましくは、宿主細胞が增殖している培養培地中への抗体の分泌を可能とするのに十分な時間培養することにより産生される。抗体は、標準的なタンパク質精製法を用いて培養培地から回収することができる。

10

【0154】

種々の細胞株により、またはトランスジェニック動物で発現された抗体は、互いに異なるグリコシル化を持っている可能性がある。しかしながら、本明細書で提供されるポリヌクレオチドによりコードされる、または本明細書で提供されるアミノ酸配列を含んでなる抗体は総て、本発明の一部である。

20

【0155】

以下、下記の例で実施態様を説明する。

【実施例】

【0156】

細胞株NCI-H929、HL-60、K562、Z138、OVCA8-3およびDu145は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから入手した。細胞株C33A、SKOV-3、ES-2、NCI/ADR-ResおよびDoHH2は、BCキヤンサー・エージェンシーにより提供された。移植腫瘍もBCキヤンサー・エージェンシーにより提供された。末梢血白血球は、正常な健康ドナーにより提供された新鮮な血液から調製した。その他の正常初代細胞はSciencellから入手した。抗PrP6H4抗体は、Prionicsから入手した。NCI/ADR-Resは、OVCA8-8に由来する。これは卵巣癌である。OVCA8-3およびSKOV-3は、卵巣腺癌である。ES-2およびLTL-382は、卵巣明細胞癌である。LTL-409は、卵巣未分化胚細胞腫である。

30

【0157】

モノクローナル抗体の作製

配列MDEYSNQNN（配列番号14）を含んでなるペプチドを、標準的な方法を用いて合成した後、担体タンパク質と結合させた。調製した免疫原は、KLH-Cys-MDEYSNQNNおよびOVA-Cys-MDEYSNQNNの両方を含んでいた。

40

【0158】

ニュージーランド・ホワイトウサギを、完全フロイントアジュバント中0.4mgのペプチド-KLH複合体で皮下免疫した。初回免疫の後、動物に2~3週間毎に数回、追加免疫を行った。イムノアッセイで最良の力価を有するウサギに再びペプチド抗原で静脈から追加免疫を行い、4日後に脾臓を摘出した。従来PEG細胞融合法を用いて、ハイブリドーマ融合を行った。免疫したウサギから脾細胞を採取し、PEG4000（Sigma Chemical、セントルイス、MO）を用いてウサギ形質細胞腫細胞240E-W2（US5675063）と融合させ、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン）により選択した。ハイブリドーマの選択の後、上清を回収し、種々のアッ

50

セイで評価した。選択されたハイブリドーマを、次に、限界希釈によりサブクロニングしてモノクローナルハイブリドーマを得た。

【0159】

モノクローナル a b 1 2 0 の抗体重鎖および軽鎖遺伝子を前記ハイブリドーマ細胞からクロニングした。全 RNA を抽出し、Qiagen TurboCapture mRNA キットを用い、逆転写して cDNA を得た。ウサギ IgG の L 鎖の DNA フラグメントおよび H 鎖の可変領域 (VH) を、ウサギ H および L 鎖プライマーを用いて PCR により増幅した。L 鎖フラグメントを pTT5 哺乳類発現ベクターにクロニングし、VH フラグメントを H 鎖 pTT5 重鎖ベクターの定常領域にインフレームで融合させた。各ハイブリドーマクローンについて、H 鎖および L 鎖の 3 つのプラスミド DNA クローンの配列決定を行い、特性決定のために組換え RabMAb を発現させた。

10

【0160】

EndoFree (登録商標) プラスミド精製キット (Qiagen) を用い、a b 1 2 0 の IgG 重鎖および軽鎖をコードするプラスミドを形質転換大腸菌から単離した。ヒト HEK-293-6E 細胞を、a b 1 2 0 抗体の一過性発現のために用いた。抗体プラスミドを対数増殖期の細胞に、FreeStyle (商標) MAX 試薬 293 フェクチン (Invitrogen、Cat: 51-0031) を用いてトランスフェクトし、FreeStyle (商標) 293 発現培地 (Invitrogen、Cat: 12338-18) 中で製造者の説明に従って培養した。トランスフェクト細胞をオービタルシェーカーにて 5% CO₂ 下、37 °C で 7 日間培養した。7000 rpm で 15 分間回転させて細胞残渣を除去することにより、培養培地中に分泌した抗体を回収した。明澄な培養上清を、内毒素不含条件下、プロテイン A クロマトグラフィー (HiTrap (商標) rProtein A FF、GE healthcare、CAT: 17-5080-01) により精製した。抗体をクエン酸溶出バッファー (SIGMA、CAT: C2404-100G) にてカラムから溶出させ、重炭酸ナトリウムバッファーで中性 pH に調整した。抗体調製物を濃縮し、PBS バッファーに交換した。最終抗体調製物の IgG 濃度および内毒素レベルを、それぞれ OD_{280nm} の定量および Tachypleus Amebocyte Lysate ゲルクロットアッセイ (Zhanjiang A&C Biological Ltd) によって決定した。

20

【0161】

モノクローナル抗体 a b 1 2 0 をプロテイン A により精製した。精製抗体を濾過除菌し、PBS バッファー (pH 7.4) 中、4 °C で保存した (stored at 4C)。タンパク質濃度を UV 吸収 (280 nm) アッセイにより決定し、PBS バッファーをブランクバッファーとして用いた。終濃度は 3 回の読み取りの平均であり、> 2 mg/ml の吸収要件を得た。

30

【0162】

タンパク質純度を測定するため、Bio-Rad ミニ電気泳動システムを製造者の説明に従って用い、SDS-PAGE を行った。次に、ゲルをクーマシーブリリアントブルーで染色した。分離ゲルは 12% アクリルアミドであり、濃縮ゲルは 4% アクリルアミドであり、サンプル添加量は 4 μg/レーンとした。アッセイサンプルは還元 SDS-PAGE では 2 本のバンド (重鎖および軽鎖) を示し、非還元 SDS-PAGE では 1 本のバンド (完全 IgG 分子) を示した。

40

【0163】

内毒素レベルもまた、Gel Clot Tachypleus Amebocyte Lysate (TAL) キットにより、内毒素標品と内毒素不含水を用いて評価した。結果は、内毒素レベルが 1 EU/ml タンパク質未満であることを示した。

【0164】

よって、好ましい実施態様では、抗体は、添加用量 4 μg/レーンで非還元 SDS-PAGE により測定し、280 nm で検出した場合に、(a) 約 1 EU/ml タンパク質未満、(b) 約 2 mg/ml を超える濃度、および (c) 1 本のタンパク質バンドとしての

50

移動を示す調製物として提供される。

【0165】

抗ペプチドELISA

Maxisorp 96ウェルプレート、2~8 にて一晚、PBS中、100ng/ウェルのBSA-ペプチドでコーティングした。PBST/カゼインでブロッキングした後、一次抗体を加え、室温で1時間インキュベートした。ウサギ抗体は、ヤギ抗ウサギIgG-HRPとTMB基質を用いて検出した。0.25M硫酸で反応を停止させた後、450nmで吸光度を測定した。

【0166】

変性PrP ELISA

組換えPrP(Alicon)をLDSサンプルバッファー(Life Technologies)およびサンプル還元剤(Life Technologies)と混合し、80 で20分間加熱した。15分間冷却した後、Maxisorp 96ウェルプレートを100ng/ウェルの変性PrPでコーティングし、2~8 にて一晚インキュベートした。PBST/BSAでブロッキングした後、一次抗体を加え、室温で1時間インキュベートした。後の行程は、抗ペプチドELISAに関して記載した通りとした。

10

【0167】

His-PrP捕捉ELISA

Maxisorp 96ウェルプレートを2~8 にて一晚、PBS中、100ng/ウェルのヤギ抗His-6抗体(QED)でコーティングした。PBST/BSAでブロッキングした後、His-PrP(Alicon)を加え、室温で1時間インキュベートした。一次抗体の添加および後の行程は、抗ペプチドELISAに関して記載した通りとした。

20

【0168】

FACSのための細胞調製

接着腫瘍細胞株および初代細胞を、非酵素系細胞解離バッファー(Invitrogen)を用いてフラスコから解離された。末梢血単核細胞は、採取当日に標準的なフィコール遠心分離法を用い、新鮮なクエン酸血から調製した。他の初代細胞は10%DMSO中で凍結させ、試験当日に解凍した。移植腫瘍をマウスから外科的に摘出した。腫瘍をはさみで刻んだ後、37 にて30分間、振盪しながらコラゲナーゼ/ヒアルロニダーゼ(Worthington Biochemical)で処理した。この混合物を40µmスクリーンに通すことにより、個々の腫瘍細胞を回収した。

30

【0169】

FACS

Fc受容体を有する細胞を10%正常ヒト血清で処理して受容体をブロッキングした。細胞を2~8 で30分間、一次抗体とともにインキュベートした。洗浄した後、細胞を2~8 で30分間、ヤギ抗ウサギAF488とともにインキュベートした。最終の洗浄後、細胞を1µg/mLのヨウ化プロピジウム中でインキュベートした。Becton Dickinson FACSCaliburまたはBecton Dickinson FACS Canto IIのいずれかとFACS Expressソフトウェア(De Novo Systems)を用いて細胞を分析した。

40

【0170】

ペプチド、変性PrPまたは腫瘍細胞と結合する抗体の親和性測定

ペプチドまたは変性PrPに対する抗体の結合は、上記のようにELISAにより行った。腫瘍細胞に対する抗体の結合は、上記のようにFACSにより行った。抗体の力価を測定して結合曲線を得た。EC50値は、GraphPadソフトウェアを用いて計算した。

【0171】

細胞のプロテイナーゼK処理

接着腫瘍細胞株を、非酵素系細胞解離バッファー(Invitrogen)を用いてフ

50

ラスコから解離させた。初代細胞を10% DMSO中で凍結させ、試験当日に解凍した。細胞を37℃で30分間、種々の濃度のプロテイナーゼKで処理した。その後、細胞を洗浄し、上記のようにFACSにより抗体結合を測定した。

【0172】

細胞のパクリタキセル処理

細胞を6ウェルプレートに播種し、一晚接着させた。翌日、培地を除去し、種々の濃度のパクリタキセルを含有する新鮮培地に置換した。細胞を37℃/5%CO₂で一晩インキュベートした。翌日、非酵素系細胞解離バッファーを用いて細胞を解離させ、洗浄し、抗体結合を上記のようにFACSにより評価した。

【0173】

免疫複合体例

合成

Ab 1c-120とウレアーゼを、リンカーとしてS I A B (スクシンイミジル-(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート)を用いてコンジュゲートすることにより、免疫複合体を形成した。S I A Bは、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステルおよびヨードアセチル反応性基を介したアニム(anime)-スルフヒドリルコンジュゲーション用の、中程度の長さの架橋剤である。このS I A Bは、約10.6オングストローム長のスペーサーアームを生じる。S I A Bは、Thermo Scientificから市販されており、コンジュゲーションにおけるその使用は、例えば、Hermanson, Bioconjugate Techniques, 1996, San Diego, Academic Press pp 542, 553, 568に記載されている。

【0174】

まず、抗体1c-120を、元のバッファーマトリックスのpHにてS I A B (モル比S I A B : I g G = 3.8 : 1)で70分間処理した。次に、室温で10分間、Tris-HClバッファーを終濃度5mMまで添加して反応を急冷した。得られた溶液を氷/水で冷却し、冷却した高純度ウレアーゼ(5mg/ml、~0℃、GMP級タチナタマメウレアーゼ)をボルテックスにかけながら添加した。タンパク質モル比は1 : 2 / I g G : H P Uであった。Tris-HCl(200mM、pH 8.45)1/10容量を加え、90分かけてpHを8.0~8.3に調整した。安定化のために、加水分解S I A Bを加え、ウレアーゼの表面ヒドロ亜硫酸基の大部分をクープ(coup)した。モル比は1 : 7 (ウレアーゼ : ヒドロ-S I A B)であった(室温、30分)。

【0175】

次に、システイン溶液(200mM Tris-HClバッファーpH 8.45中100mM)を終濃度5mMまで加えることにより、室温で10分間、反応を急冷した。得られた混合物に対してG E h e a l t h c a r e S u p e r o s e 6 10/300カラムを用いたS E C分離を行い、画分を回収した。F10~13分の画分をプールし、1%スクロースおよび0.2mM E D T Aを含有する20mMのアルギニンバッファーpH 7.0に対して透析した(MWCO 12~14kD)。次に、回収したサンプルをS D S - P A G E、B C Aプロトコルを用いたタンパク質アッセイ、チューブプロトコルを用いたウレアーゼ-酵素活性アッセイ、およびE L I S A結合アッセイによって分析し、免疫複合体が活性であることを明らかにした(図9および10)。

【0176】

これらの試験の結果、下記のことになった：

タンパク質濃度はB C Aにより0.5mg/ml；

ウレアーゼ酵素活性は1030U/ml；

ウレアーゼ比活性は2060U/mg；

平均コンジュゲーション比は2I g G / ウレアーゼ；

総生成物：6.0ml溶液中、3mg

バッファー組成物：20nMアルギニン、0.2mM E D T A、1%スクロース、pH 7.0。

10

20

30

40

50

【0177】

ウレアーゼおよびウレアーゼ複合体の活性アッセイ

ウレアーゼまたはウレアーゼ複合体の酵素活性を、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GLDH) と組み合わせた酵素反応で行った。酸化した NADH の量を、340 nm での吸光度の変化を測定することにより決定した (Kaltwasser, H. and Schlegel, H. G., Anal. Biochem., 16, 132, 1966)。用いた試薬は、0.10 M リン酸カリウムバッファー pH 7.6; リン酸バッファー中に調製した 1.80 M 尿素; バッファー中 0.025 M アデノシン-5'-ジホスフェート (ADP) (10.7 mg/ml); リン酸バッファー中 0.008 M NADH (5 mg/ml); リン酸バッファー中 0.025 M α -ケトグルタル酸塩 (3.7 mg/ml); アンモニウムイオン不含グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GLDH) 溶液; アッセイ前に新たに調製した 50 U/ml リン酸バッファーであった。ウレアーゼ溶液は、0.1 ~ 0.5 U/ml の濃度となるようにリン酸バッファーに溶かすことによって調製した。この溶液はアッセイ前に新たに調製した。

10

【0178】

キュベットに 2.0 mL のリン酸バッファー 2.40 mL の後に、各 0.10 mL の尿素、ADP、NADH、GLDH および α -ケトグルタル酸塩を添加することによりアッセイを開始した。分光光度計を 340 nm および 25 °C に調節した。成分を加えたキュベットを 25 °C の分光光度計に 5 分間入れて温度の平衡化を行った後、存在する場合には 340 nm でブランク比を確定した。

20

【0179】

酵素反応を開始させるため、0.1 mL のウレアーゼ溶液を前記キュベットに加えた。340 nm での吸光度の変化を 15 分間記録した。酵素活性を、1 分当たりの 340 nm での吸光度の低下と相関させた。

【0180】

in vitro 細胞傷害性アッセイ

試薬を 2 時間、腫瘍細胞とともにインキュベートした。細胞を 2 回洗浄した後、20 mM 尿素とともに 30 分間インキュベートした。細胞生存率は、WST-1 を添加し、16 ~ 20 時間後に吸光度を測定することにより評価した。

【0181】

前臨床有効性試験

ES-2 細胞を細胞培養で増殖させた。試験 0 日目に、 5×10^6 細胞を皮下移植した。腫瘍が平均 100 mm^3 に達したところで、週に 3 回、iv 投与を開始した。腫瘍成長は、カリパスで腫瘍寸法を測定することによりモニタリングした。腫瘍体積は、式 $L \times W^2 / 2$ に従って計算した。マウスは腫瘍が 800 mm^3 に達した際に終了とするか、または重度に潰瘍形成させた。

30

【0182】

結果

Promis (商標) アルゴリズム (WO2010/040209 に記載) を用いて、ヒト PrP の DSE を同定した。DSE3 はリジッドループエピトープと呼ばれ、シート 2 と α -ヘリックス 1 の間に位置する。

40

【0183】

特定の配列 MDEYSNQNN (配列番号 14) および 2 つの異なる免疫原、すなわち、KLH-Cys-DSE3 と OVA-Cys-DSE3 を用いて抗 DSE3 抗体を生成した。ウサギを材料および方法に記載の通りに免疫し、ウサギからの抗血清を評価した。ウサギは免疫原ペプチドに対して優れた応答を示した (図 1a)。さらに、抗血清は、全長変性 PrP との優れた結合を示した (図 1b)。融合を行った後、モノクローナル抗体を作製した。その後、DSE3 に対して生成した 7 つの組換えウサギモノクローナル抗体を十分に評価した。

【0184】

抗体を、免疫原ペプチドとの結合に関して試験したところ、7 つの抗体の総てが優れた

50

力価を示した(図2)。ペプチド結合に対する EC_{50} 値は、ELISAにより決定した。総ての抗体がペプチドに対して極めて高い親和性を示し、 EC_{50} は 10^{-11} Mの範囲であった(表1)。

【0185】

次に、総ての抗体を、変性全長組換えPrPとの結合に関してELISAにより試験した(図3)。1つの抗体が、変性PrPに対して、 10^{-11} M範囲の抗ペプチド親和性と同程度の力価を示した(表1)。従って、好ましい本抗体は、この試験によって、少なくとも 10^{-10} Mより良好な EC_{50} を好ましく示す。

【0186】

【表1】

表1

| 抗体 | ペプチドに対する EC_{50} (M) | 変性タンパク質に対する EC_{50} (M) |
|------------|---------------------------|------------------------------|
| DSE3 ab1 | 5.65E-11 | 1.09E-07 |
| DSE3 ab90 | 5.43E-11 | 2.22E-10 |
| DSE3 ab94 | 5.79E-11 | 2.20E-10 |
| DSE3 ab116 | 1.66E-10 | 5.52E-07 |
| DSE3 ab119 | 5.25E-11 | 8.90E-08 |
| DSE3 ab120 | 6.55E-11 | 8.80E-11 |
| DSE3 ab166 | 5.24E-11 | 1.73E-10 |

【0187】

残りの抗体は、変性タンパク質に対してペプチドよりも低い親和性($10^{-7} \sim 10^{-10}$ Mの範囲)を示した。また、抗体は総て、捕捉したHisタグを有するPrPとの結合に関してもELISAにより試験した(図3)。捕捉されたHis-PrPとの結合を示した抗体は無かった。

【0188】

7つ総ての抗体を、11種の腫瘍細胞株、6種の移植原発ヒト腫瘍、および9種の正常細胞のパネルとの結合に関して試験した(表2)。

【0189】

10

20

30

【表 2】

表 2

| 抗体 (10 μ g/mL) | 平均 S/N | | |
|-----------------------|-----------------|------------------------------|---------------|
| | 腫瘍細胞株 (n=11) | NOD-SCID マウスを経た原発腫瘍 (n=6) | 正常細胞 (n=9) |
| DSE3 ab1 | 1.05 | 1.20 | 1.07 |
| DSE3 ab90 | 1.48 | 1.06 | 1.76 |
| DSE3 ab94 | 1.03 | 1.04 | 1.04 |
| DSE3 ab116 | 1.08 | 1.07 | 1.10 |
| DSE3 ab119 | 1.03 | 1.17 | 1.03 |
| DSE3 ab120 | 2.28 | 1.48 | 1.39 |
| DSE3 ab166 | 1.06 | 1.10 | 1.21 |

10

20

【 0 1 9 0 】

2つの抗体のみが、腫瘍細胞株との結合を示した(DSE3 ab90およびDSE3 ab120)。正常細胞との結合に関して試験した際、DSE3 ab90は、腫瘍細胞に対よりも正常細胞に対して強い結合を示した。DSE3 ab120も正常細胞に対して少量の結合を示したが、これは腫瘍細胞株および継代原発腫瘍の両方に対して見られた結合量よりも少なかった。DSE3 ab120の結合は卵巣腫瘍細胞に対して特に強く(図4)、この抗体は試験した6種のうち5種の卵巣腫瘍に良く結合したが、3人の異なるドナーからの正常卵巣上皮細胞には結合しなかった。PrPは試験した総ての卵巣細胞で発現するが(図4)、程度は異なる。この全体的なPrPレベルの違いを説明するために、DSE3 ab120の結合を対照PrP抗体6H4の結合に対して正規化した(表3)。

30

【 0 1 9 1 】

【表 3】

表 3

| 細胞 ID | 細胞種 | 6H4 対照 PrP ab の平均 S/N(A) | DSE3 ab120 の平均 S/N(B) | 正規化した DSE3 ab 120 結合 (B-1)/(A-1)*100 |
|-----------------|------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|--|
| ES-2 | 卵巣腫瘍 細胞株 | 52.45 | 4.43 | 10.44 |
| OVCAR-3 | | 10.89 | 2.17 | 11.15 |
| SKOV-3 | | 42.02 | 3.62 | 6.33 |
| NCI/ADR-Res | | 48.89 | 2.57 | 3.13 |
| LTL-409 | マウスに 移植し増 殖させた 卵巣腫瘍 | 3.51 | 2.79 | 71.56 |
| LTL-382 | | 1.88 | 1.09 | 9.84 |
| HOEpiC ドナー 1 | 正常卵巣上 皮 | 8.31 | 1.16 | 2.22 |
| HOEpiC ドナー 2 | | 14.17 | 1.27 | 2.02 |
| HOEpiC ドナー 3 | | 15.10 | 1.32 | 2.25 |

10

20

30

【 0 1 9 2 】

6種の腫瘍細胞に関して、正規化したDSE3 ab120結合は、低いものでは3.1～高いものでは71.6(平均=18.8)の範囲であった。しかしながら、正規化したDSE3 ab120の結合は、正常卵巣細胞に対しては2.0～2.3の範囲に過ぎなかった。

【 0 1 9 3 】

腫瘍細胞に対するDSE3 ab120の親和性を決定するために、3種の卵巣腫瘍細胞株で抗体の力価測定を行った(図5)。また、2種の正常細胞でも抗体の力価測定を行い、DSE3 ab120がこれらの正常細胞には結合しないという最初の知見を確認した。最大40μg/mLの抗体を試験したとしても、腫瘍細胞上で結合飽和には到達せず、親和性は判定できなかった。同じ実験で、PrP対照抗体6H4についても力価測定を行ったところ、結合飽和に達した(図5)。6H4については、平均算定EC50は 1.7×10^{-8} Mであり、腫瘍細胞および正常細胞ではEC50に有意差は無かった。腫瘍細胞に対するDSE3 ab120の結合は6H4よりも親和性が低いので、DSE3 ab120に対するEC50は 1.7×10^{-8} Mより低いはずであり、従って、変性PrPに対するDSE3 ab120の結合よりも少なくとも1log低い(8.6×10^{-10} M)。

40

【 0 1 9 4 】

50

卵巣腫瘍細胞の細胞表面で発現されるPrPのコンフォメーションをさらに調べるために、3種の卵巣腫瘍細胞株を一定の濃度範囲のプロテイナーゼK(PK)で処理し、これらの細胞によって発現されるPrPタンパク質のPK感受性を決定した。天然変性(natively unfolded)N末端ドメインはPK感受性である(図6、3F4エピトープ)。C末端構造ドメイン(1)はプロテイナーゼK耐性である(図6、6H4エピトープ)。リジッドループ(S2-2)は、中間のPK感受性を持ち(図6、DSE3-ab120エピトープ)、リジッドループは、DSE3-ab120の接近性とPK感受性の2つの判定基準により、そのコンパクトな天然構造を欠いていることを示す。各腫瘍株およびエピトープに関するPK-EC50値を算出した(表4)。

【0195】

【表4】

表4

| 腫瘍株 | EC ₅₀ (mg/mL) (4回または5回の実験の平均値) | | |
|-------------|--|--------|------------|
| | 3F4 | 6H4 | DSE3-ab120 |
| ES-2 | 0.0121 | 1.1788 | 0.0385 |
| SKOV-3 | 0.0111 | 1.3320 | 0.2157 |
| NCI-ADR Res | 0.0126 | 0.8170 | 0.4380 |
| 平均 | 0.0119 | 1.1093 | 0.2307 |

【0196】

また、正常卵巣細胞により発現されたPrPに関してもPK感受性を評価した(図7)。PK-EC50値は腫瘍細胞と正常細胞の間で有意差があり、PrPは正常細胞に比べて卵巣腫瘍細胞の表面で部分的に変性(ミスフォールド)されていることを示す。

【0197】

PrPコンフォメーションに対する化学療法薬パクリタキセルの影響を、卵巣細胞を漸増濃度のパクリタキセルとともに一晩インキュベートした後、DSE3-ab120を用いて検出を行うことにより検討した。図8に示されるように、パクリタキセル処理は、試験した卵巣腫瘍でDSE3-ab120結合を増し、3人の独立したドナーから得た3種の正常卵巣細胞では結合を増大させなかった。pan-PrP抗体6H4の結合により示されるように、総PrPのレベルは一般に一定に維持されることから、パクリタキセルは卵巣腫瘍の細胞表面でPrPの構造変化を誘導しているが、正常細胞ではそうではない。

【0198】

in vivo有効性を促進するために、AMF-1c-120をウレアーゼとコンジュゲートした。コンジュゲーション後、ペプチド、変性PrP、および細胞に対する抗体の結合を評価したところ(図9および10)、抗体結合はウレアーゼのコンジュゲーション時も維持される。in vitroにおけるAMF-1c-120/ウレアーゼの活性を、腫瘍細胞株を抗体単独、抗体/ウレアーゼ、またはウレアーゼ単独とともにインキュ

10

20

30

40

50

ベートすることにより試験した。ウレアーゼ単独でいくらかの毒性が見られたが、著しく高い毒性がAMF-1c-120/ウレアーゼにより媒介された。よって、AMF-1c-120/ウレアーゼは、in vitroにおいて細胞傷害性がある。

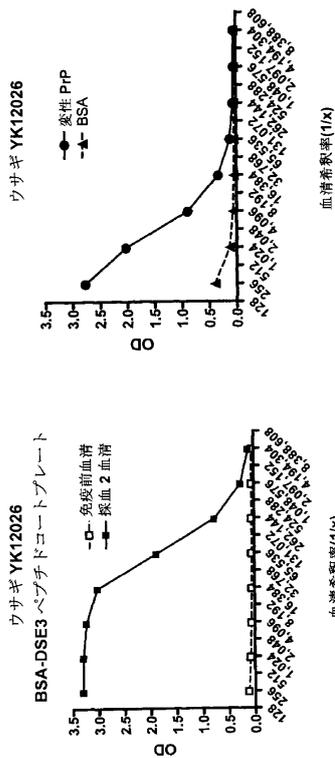
【0199】

in vivoにおけるAMF-1c-120/ウレアーゼの有効性をES-2異種移植モデルで試験したところ(図12)、腫瘍成長に対する効果が示唆される。

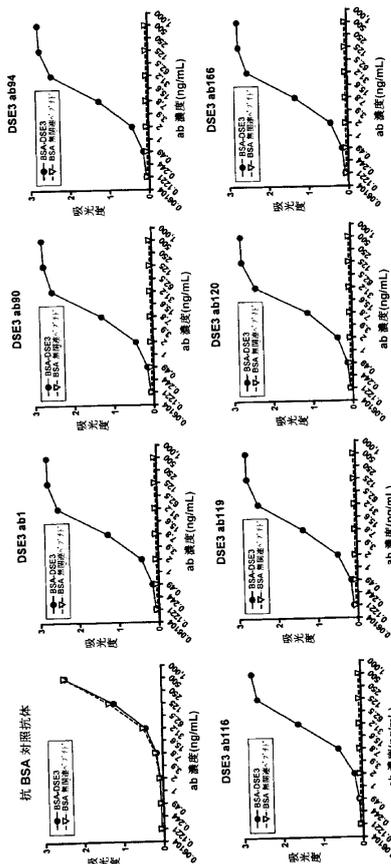
【0200】

総てのデータベース参照およびそこに参照される配列情報を含む、本明細書に引用される総ての参考文献は、引用することによりその全内容が本明細書の一部とされる。

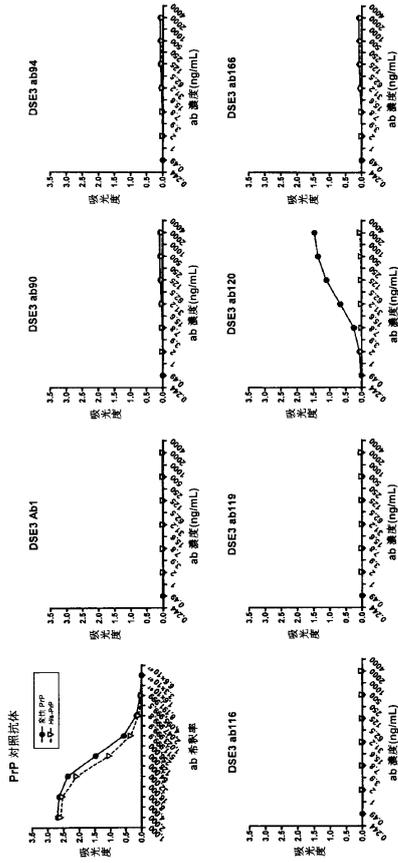
【図1】



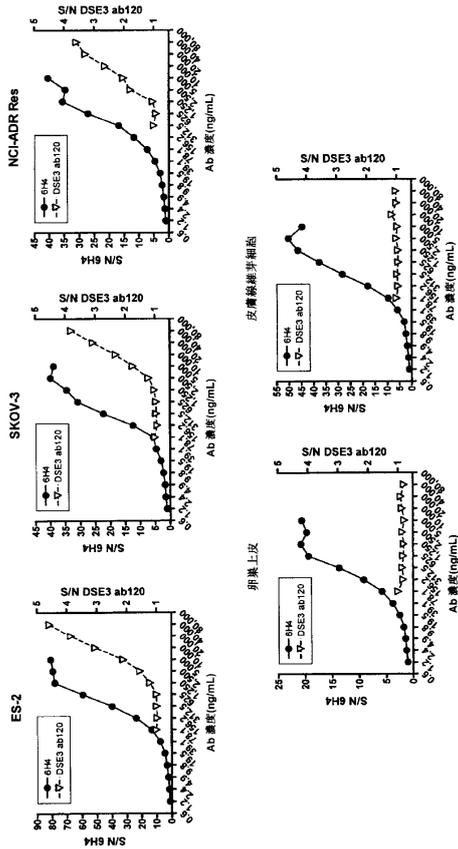
【図2】



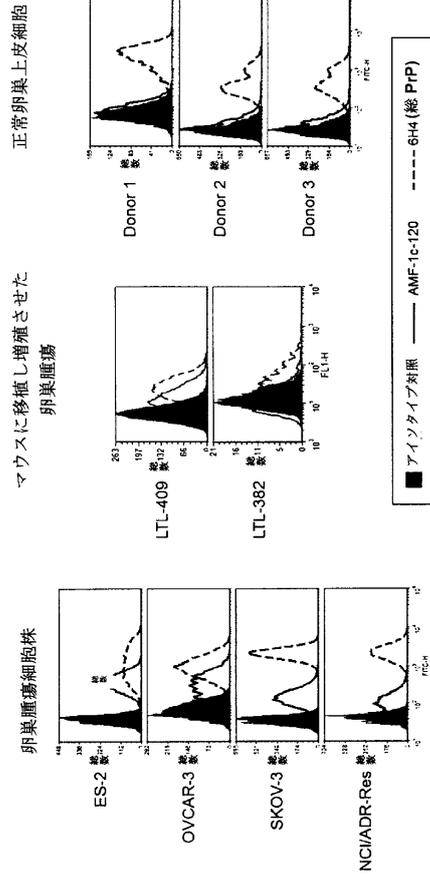
【 図 3 】



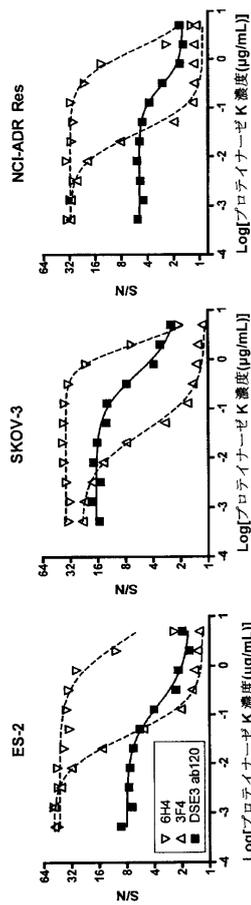
【 図 5 】



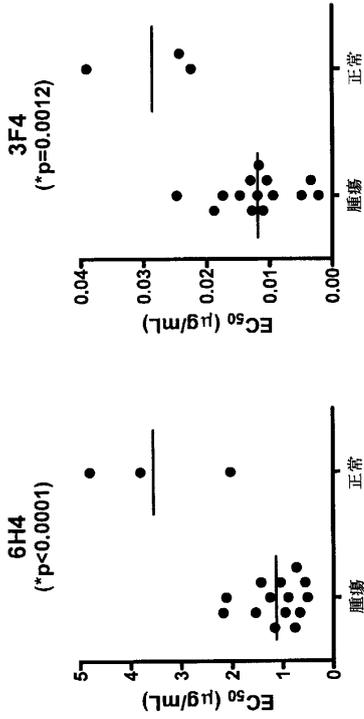
【 図 4 】



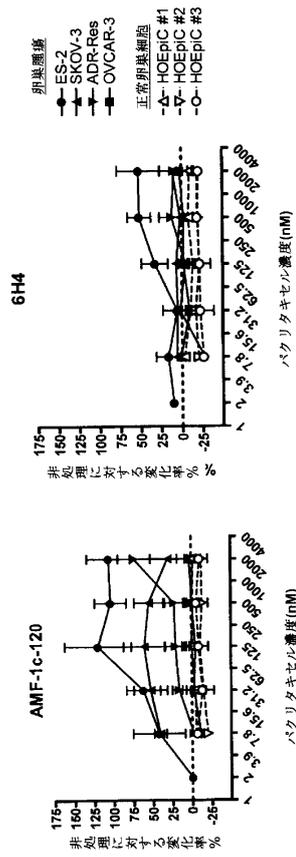
【 図 6 】



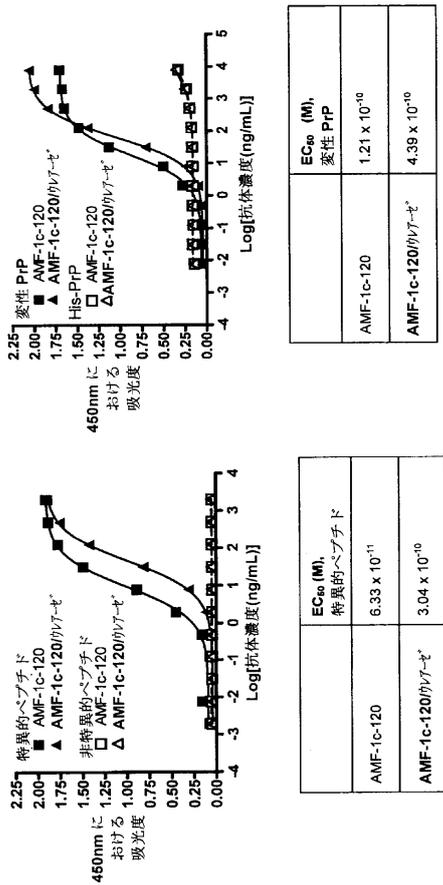
【 図 7 】



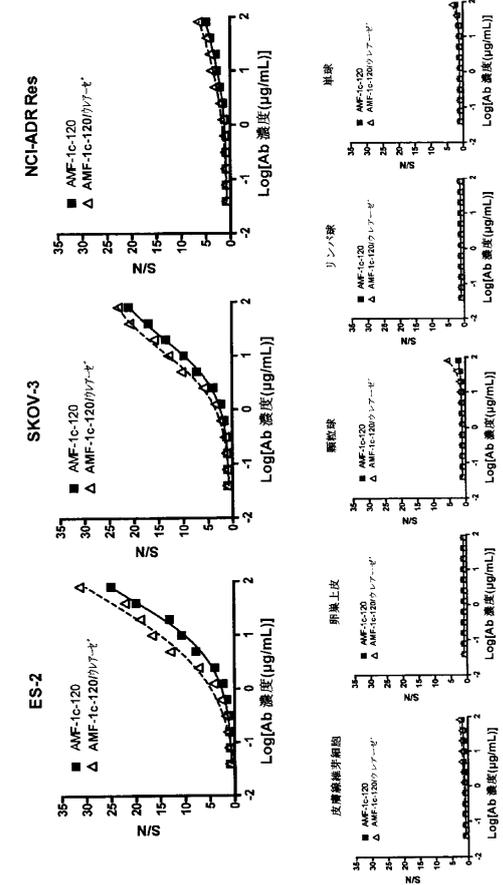
【 図 8 】



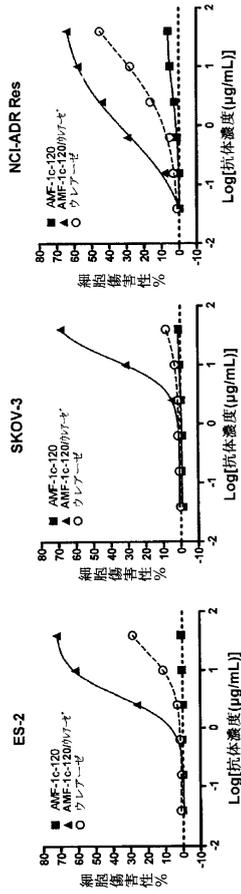
【 図 9 】



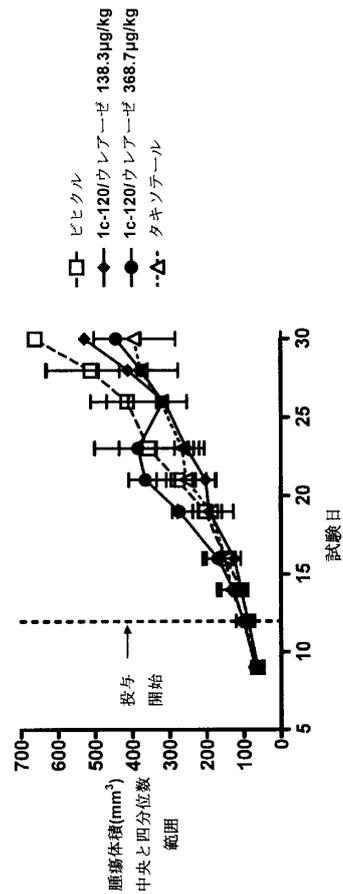
【 図 10 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 配列表 】

0006430373000001.app

フロントページの続き

| | | | |
|----------------|-----------|----------------|-------|
| (51)Int.Cl. | | F I | |
| A 6 1 K 38/08 | (2006.01) | A 6 1 K 38/08 | |
| A 6 1 K 38/10 | (2006.01) | A 6 1 K 38/10 | |
| A 6 1 P 35/00 | (2006.01) | A 6 1 P 35/00 | |
| A 6 1 P 43/00 | (2006.01) | A 6 1 P 43/00 | 1 0 5 |
| A 6 1 P 35/02 | (2006.01) | A 6 1 P 35/02 | |
| A 6 1 P 25/00 | (2006.01) | A 6 1 P 25/00 | |
| A 6 1 K 39/395 | (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | N |
| G 0 1 N 33/53 | (2006.01) | G 0 1 N 33/53 | D |
| C 1 2 N 15/06 | (2006.01) | C 1 2 N 15/06 | |
| C 1 2 P 21/08 | (2006.01) | C 1 2 P 21/08 | |

(73)特許権者 514316422

ヘリックス、バイオフィルマ、コーポレーション

HELIX BIOPHARMA CORP.

カナダ国オンタリオ州、オーロラ、インダストリアル、パークウェイ、サウス、305、ユニット、3

(74)代理人 100091487

弁理士 中村 行孝

(74)代理人 100117787

弁理士 勝沼 宏仁

(74)代理人 100120617

弁理士 浅野 真理

(74)代理人 100126099

弁理士 反町 洋

(72)発明者 マーニ、ダイアン、ウジェ

カナダ国オンタリオ州、リッチモンド、ヒル、レディット、コート、20

(72)発明者 ビエントン、チャイ

カナダ国オンタリオ州、ブランプトン、アルダーウェイ、アベニュー、44

(72)発明者 ペロニカ、チョルフィ

カナダ国オンタリオ州、ブランプトン、クリークウッド、ドライブ、8

(72)発明者 ニール、アール、キャッシュマン

カナダ国ブリティッシュコロンビア州、バンクーバー、ウエスト、キング、エドワード、アベニュー、3793

(72)発明者 バオミン、ティアン

カナダ国アルバータ州、エドモントン、サウスウエスト、マクマレン、ウェイ、4325

(72)発明者 ワー、ヤオ、ウォン

カナダ国アルバータ州、エドモントン、セント、ノースウエスト、8812-188

(72)発明者 ヒマン、ラブ、マン、チャオ

カナダ国オンタリオ州、オーロラ、ホガブーム、アベニュー、5

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 特表2012-504801(JP,A)

特表2007-502966(JP,A)

特表2003-521477(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/18

C07K 7/00

C12N 15/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

WPIDS/WPIX(STN)