

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-507951

(P2008-507951A)

(43) 公表日 平成20年3月21日 (2008.3.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B O 6 4
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 7 6
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 4
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 49 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2006-543403 (P2006-543403)
 (86) (22) 出願日 平成16年11月12日 (2004.11.12)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年7月12日 (2006.7.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2004/012970
 (87) 国際公開番号 W02005/047332
 (87) 国際公開日 平成17年5月26日 (2005.5.26)
 (31) 優先権主張番号 03026161.4
 (32) 優先日 平成15年11月14日 (2003.11.14)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 507274087
 パトリス・リミテッド
 オーストラリア国ビクトリア 3000,
 メルボルン, フリンダーズ・レイン 51
 7, レベル 2
 (74) 代理人 100118315
 弁理士 黒田 博道
 (74) 代理人 100120488
 弁理士 北口 智英
 (72) 発明者 フォルマーズ ハイנטツ
 ドイツ連邦共和国 97084 ヴェルツ
 ブルグ ブダペスターシトラーセ 23

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腺癌の特殊な抗体とその使用法

(57) 【要約】

【課題】 例えば肺の腺癌，胃の腫瘍，結腸の腺癌，前立腺の腺癌，胸部の腺管癌，膵臓の腺癌，卵巣の腺癌、または子宮の腺癌などを早期に医学的に検出し、長期の寿命を確保すること。

【解決手段】

S E Q I D N O : 1 および / または S E Q I D N O : 3 との配列に殆んど等しいアミノ酸配列を備えるポリペプチドであって、前記ポリペプチドが腫瘍性細胞とは明確に結合するが、非腫瘍性の細胞には結合することがないものとする精製ポリペプチドを提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SEQ ID NO: 1 および / または SEQ ID NO: 3 との配列に殆んど等しいアミノ酸配列を具備するポリペプチドであって、前記ポリペプチドを BXP C - 3 (ATCC 受け入れ番号 CRL - 1687), 23132 / 87 (DSMZ 受け入れ番号 ACC 201), COLO - 206 F (DSMZ 受け入れ番号 ACC 21), COLO - 699 (DSMZ 受け入れ番号 ACC 196) 及び LOU - NH91 (DSMZ 受け入れ番号 ACC 393) 細胞と明確に結合し、非腫瘍性細胞とは結合するものではないものとする腫瘍性の細胞に結合することを特徴とする精製ポリペプチド。

【請求項 2】

前記ポリペプチドが SEQ ID NO: 1 および / または SEQ ID NO: 3 の配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、前記ポリペプチドが BXP C - 3 (ATCC 受け入れ番号 CRL - 1687), 23132 / 87 (DSMZ 受け入れ番号 ACC 201), COLO - 206 F (DSMZ 受け入れ番号 ACC 21), COLO - 699 (DSMZ 受け入れ番号 ACC 196) 及び LOU - NH91 (DSMZ 受け入れ番号 ACC 393) 細胞に明確に結合し、非新生物の細胞に結合することなく、そして前記腫瘍性の細胞が肺の腺癌、扁平細胞肺癌、腸型胃癌、広汎性胃癌、結腸の腺癌、前立腺の腺癌、食道の扁平細胞癌、食道の腺癌、胸の食道小葉の癌、胸の管癌、膵臓の腺癌、卵巣の腺癌および子宮細胞の腺癌である腫瘍性の細胞に結合することを特徴とする精製ポリペプチド。

【請求項 3】

前記ポリペプチドが SEQ ID NO: 1 および / または SEQ ID NO: 3 の配列に実質的に同一のアミノ酸配列を有し、前記ポリペプチドが肺の腺癌、扁平細胞肺癌腫、腸型胃癌、散在型胃癌、結腸の腺癌、前立腺の腺癌、食道の扁平細胞癌腫、食道の腺癌、胸の小葉癌、胸の管癌、膵臓の腺癌、卵巣の腺癌及び子宮細胞の腺癌に特に結合し、非腫瘍性の細胞とは結合することが無いことを特徴とする腫瘍性の細胞と結合する精製ポリペプチド。

【請求項 4】

前記ポリペプチドが腫瘍性の細胞に結合した際に細胞の増殖を阻害しても、非腫瘍性細胞の細胞増殖はこれを阻止することが無いようにしたことを特徴とする前記請求項 1, 2 または 3 のいずれかに記載の精製ポリペプチド。

【請求項 5】

前記ポリペプチドを低濃度のリボプロテイン (LDL) および / または酸化した低濃度のリボプロテイン (oxLDL) と結合すること、および / または極く低濃度リボプロテイン (VLDL) と結合し、そして非腫瘍性の細胞に結合した時に脂質の細胞内の滞留を誘発するが、非腫瘍性の細胞の枯死を招くことが無いことを特徴とする前記請求項 1, 2 または 3 のいずれかに記載の精製ポリペプチド。

【請求項 6】

前記ポリペプチドが腫瘍性の細胞と結合すると腫瘍性の細胞の枯死を招かせるが、非腫瘍性細胞の枯死を招来することが無いことを特徴とする前記請求項 1, 2 または 3 のいずれかに記載の精製ポリペプチド。

【請求項 7】

前記ポリペプチドが抗体あるいは抗体の機能的断片から成ることを特徴とする前記請求項 1, 2 または 3 のいずれかに記載の精製ポリペプチド。

【請求項 8】

前記ポリペプチドを V_L , V_H , F_V , F_C , F_{ab} , F_{ab}' 及び $F(ab')_2$ から成る部類より選択した機能的断片とすることを特徴とする前記請求項 7 に記載の精製ポリペプチド。

【請求項 9】

前記ポリペプチドを SEQ ID NO: 1 と実質的に同じである L 鎖 (V_L) の可変領域のアミノ酸配列あるいは / および SEQ ID NO: 3 と実質的に同じである H 鎖

10

20

30

40

50

(V_H)の可変領域のアミノ酸配列のものとすることを特徴とする前記請求項8に記載の精製ポリペプチド。

【請求項10】

前記ポリペプチドを前記SEQ ID NO:2と実質的に同じであるL鎖(V_L)の可変領域の核酸配列あるいは/およびSEQ ID NO:4と実質的に同じであるH鎖(V_H)の可変領域の核アミノ酸配列のものとすることを特徴とする前記請求項8に記載の精製ポリペプチド。

【請求項11】

前記機能的断片が前記SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:3の配列の断片から成ることを特徴とする前記請求項8に記載の精製ポリペプチド。

10

【請求項12】

前記機能的断片が前記SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:3と実質的に同じである断片から成ることを特徴とする前記請求項8に記載の精製ポリペプチド。

【請求項13】

前記ポリペプチドがSEQ ID NO:1のアミノ酸配列と実質的に同じである配列から成ることを特徴とする前記請求項1, 2または3のいずれかに記載の精製ポリペプチド。

【請求項14】

前記ポリペプチドが前記SEQ ID NO:3のアミノ酸配列と実質的に同じである配列から成ることを特徴とする前記請求項1, 2または3のいずれかに記載の精製ポリペプチド。

20

【請求項15】

前記ポリペプチドがSEQ ID NO:2のヌクレオチド67-99(CDR1), 145-165(CDR2)および262-288(CDR3)に実質的に同じである核酸配列から成ることを特徴とする前記請求項1, 2または3のいずれかに記載の精製ポリペプチド。

【請求項16】

前記ポリペプチドがSEQ ID NO:4のヌクレオチド91-105(CDR1), 148-198(CDR2)および295-330(CDR3)に実質的に同じである核酸配列から成ることを特徴とする前記請求項1, 2または3のいずれかに記載の精製ポリペプチド。

30

【請求項17】

前記SEQ ID NO:1のアミノ酸配列から成ることを特徴とする精製ポリペプチド。

【請求項18】

前記SEQ ID NO:3のアミノ酸配列から成ることを特徴とする精製ポリペプチド。

【請求項19】

前記SEQ ID NO:1および/またはSEQ ID NO:3のアミノ酸配列から成ることを特徴とする精製ポリペプチド。

40

【請求項20】

前記SEQ ID NO:1のアミノ酸配列

Ser - Gly - Asp - Lys - Leu - Gly - Asp - Lys - Tyr - Ala - Cys (CDR1) または Gln - Asp - Ser - Lys - Arg - Pro - Ser (CDR2) または Gln - Ala - Trp - Asp - Ser - Ser - Ile - Val - Val (CDR3) および/または Ser - Tyr - Ala - Met - His (CDR1) または Val - Ile - Ser - Tyr - Asp - Gly - Ser - Asn - Lys - Tyr - Tyr - Ala - Asp - Ser - Val - Lys - Gly (CDR2) または Asp - Arg - Leu - Ala - Val - Ala - Gly - Lys - Thr - Phe - Asp - Tyr (CDR3) SEQ ID NO:3に実質的に同じであるアミノ酸配列

50

から成る少くとも一つの相補性決定領域 (C D R) またはその機能の断片を具備することを特徴とする前記請求項 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 17 , 18 または 19 に記載の精製ポリペプチド。

【請求項 21】

前記ポリペプチドをモノクローナル抗体とすることを特徴とする前記請求項 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 17 , 18 , 19 または 20 のいずれかに記載の精製ポリペプチド。

【請求項 22】

前記モノクローナル抗体をヒトモノクローナル抗体とすることを特徴とする前記請求項 21 に記載の精製ポリペプチド。

【請求項 23】

前記請求項 1 , 2 または 3 の前記ポリペプチドを形質発現する細胞。

【請求項 24】

前記 S E Q I D N O : 1 の前記アミノ酸配列と実質的に同じである配列から成るポリペプチドを形質発現する細胞。

【請求項 25】

前記ポリペプチドが S E Q I D N O : 1 の前記配列から成ることを特徴とする前記請求項 24 に記載の細胞。

【請求項 26】

前記 S E Q I D N O : 3 の前記アミノ酸配列と実質的に同じである配列から成ることを特徴とするポリペプチドを形質発現する細胞。

【請求項 27】

前記ポリペプチドが前記 S E Q I D N O : 3 の配列から成ることを特徴とする前記請求項 26 に記載の細胞。

【請求項 28】

前記 S E Q I D N O : 1 と 3 との前記アミノ酸配列から成ることを特徴とするポリペプチドを形質発現する細胞。

【請求項 29】

前記細胞をハイブリドーマとすることを特徴とする前記請求項 23 乃至 28 のいずれかの 1 項に記載の細胞。

【請求項 30】

(a) ヘテロミエロマ細胞でリンパ球を融合し、その融合でハイブリドーマに良好な結果を及ぼす状態の下で、異質骨髓腫細胞系とリンパ球とを接触する段階と、

(b) 前記ハイブリドーマが腫瘍性細胞の増殖を抑制するポリペプチドを生成するか否かを決定する段階と、

(c) 前記リンパ球が B X P C - 3 (A T C C 受け入れ番号 C R L - 1687) , 23132 / 87 (D S M Z 受け入れ番号 A C C 201) , C O L O - 206 F (D S M Z 受け入れ番号 A C C 21) , C O L O - 699 (D S M Z 受け入れ番号 A C C 196) 及び L O U - N H 9 1 (D S M Z 受け入れ番号 A C C 393) 細胞に特に結合するポリペプチドを生成し、非新生物細胞を生成しないか否かを決定する段階とから成ることを特徴とする前記請求項 29 に記載の細胞を生成する方法。

【請求項 31】

(a) ヘテロミエロマ細胞でリンパ球を融合し、その融合でハイブリドーマに良好な結果を及ぼす状態の下で、異質骨髓腫細胞系とリンパ球とを接触する段階と、

(b) 前記ハイブリドーマが腫瘍性細胞が結合しているリピドの細胞内の滞留を誘導するポリペプチドを生成するが、非新生物の細胞内にリピドの滞留を招かないか否かを決定する段階と、

(c) 前記ハイブリドーマが、特に B X P C - 3 (A T C C 受け入れ番号 C R L - 1687) , 23132 / 87 (D S M Z 受け入れ番号 A C C 201) , C O L O - 206 F に結合するものの、非新生物細胞内の滞留を誘導しないか否かを決定する段階と、

(d) 前記ハイブリドーマが B X P C - 3 (A T C C 受け入れ番号 C R L - 1687) ,

10

20

30

40

50

23132/87 (DSMZ 受け入れ番号 ACC201), COLO-206F (DSMZ 受け入れ番号 ACC21), COLO-699 (DSMZ 受け入れ番号 ACC196)、及び LOU-NH91 (DSMZ 受け入れ番号 ACC393) 細胞と特に結合し、非新生物の細胞とは結合しないか否かを決定する段階とから成ることを特徴とする前記請求項 29 に記載の細胞を生成する方法。

【請求項 32】

(a) リンパ球を異種骨髄細胞と融合し、その融合をリンパ球に転帰するようにしてリンパ管を異種骨髄腫と接触する段階と、

(b) 前記ハイブリドーマが結合している腫瘍性細胞の枯死を招ねさせるポリペプチドを生成するが非腫瘍性細胞の枯死を誘導しないか否かを決定する段階と、

(c) 前記ハイブリドーマが BXPc-3 (ATCC 受け入れ番号 CRL-1687), 23132/87 (DSMZ 受け入れ番号 ACC201), COLO-206F (DSMZ 受け入れ番号 ACC21), COLO-699 (DSMZ 受け入れ番号 ACC196)、および LOU-NH91 (DSMZ 受け入れ番号 ACC393) 細胞と特に結合し、非腫瘍性細胞とは結合しないか否かを決定する段階とから成る前記請求項 29 に記載の細胞を生成する方法。

【請求項 33】

(a) 哺乳動物の細胞または組織試料を前記請求項 1, 2, 3, 4, 5, 6, 17, 18, 19 または 20 の精製ポリペプチドと接触する段階と、

(b) 前記精製ポリペプチドを前記細胞または組織試料と結合し、それによって前記精製ポリペプチドが前記細胞または組織試料との結合が新生物を具備する前記哺乳動物の表示となるか否かを検出する段階とから成るものとする哺乳動物に関する新生物の診断の方法において前記請求項 1, 2, 3, 4, 5, 6, 17, 18, 19 または 20 に記載の精製ポリペプチドの使用法。

【請求項 34】

前記哺乳動物をヒトとする前記請求項 33 に記載の精製ポリペプチドの使用法。

【請求項 35】

前記腫瘍を肺の腺癌, 扁平細胞肺癌腫, 腸型胃癌, 拡散型胃癌, 結腸の腺癌, 前立腺の腺癌, 食道の扁平上皮癌, 食道の腺癌, 胸の小葉癌, 胸の管癌, 脾臓の腺癌, 卵巣の腺癌および子宮細胞の腺癌とする前記請求項 33 に記載の使用法。

【請求項 36】

前記ポリペプチドを抗体とすることを特徴とする前記請求項 33 に記載の使用法。

【請求項 37】

前記ポリペプチドが放射性核種, 蛍光遺伝標識, 酵素, サイトタキシン, サイトカインおよび成長阻害剤から成る部類より選択された検出可能物質に抱合されることを特徴とする前記請求項 33 に記載の使用法。

【請求項 38】

前記ポリペプチドがタンパク質精製標識に共役されることを特徴とする前記請求項 33 に記載の使用法。

【請求項 39】

前記タンパク質精製標識を裂けることができるようにして成る前記請求項 38 に記載の使用法。

【請求項 40】

前記細胞または前記組織標本の細胞の増殖に還元を招く前記精製ポリペプチドを特徴とする前記請求項 1, 2, 3, 4, 5, 6, 18, 19, 20 或は 21 の前記精製ポリペプチドを細胞または組織試料に接触する段階から成る前記の方法を哺乳類の増殖を処理する方法に関する前記請求項 1, 2, 3, 4, 5, 6, 17, 18, 19 または 20 に記載の精製ポリペプチドを使用することを特徴とする方法。

【請求項 41】

前記哺乳類をヒトとすることを特徴とする前記請求項 40 に記載の使用法。

【請求項 4 2】

前記増殖の異常を肺の腺癌，扁平肺細胞癌腫，腸型胃癌，散在性胃癌，結腸の腺癌，前立腺の腺癌，胸の小葉癌，胸の管癌，膵臓の腺癌，卵巣の腺癌および子宮の腺癌とすることを特徴とする前記請求項 4 0 に記載の精製ポリペプチドの使用法。

【請求項 4 3】

前記ポリペプチドを抗体とすることを特徴とする前記請求項 4 0 に記載の使用法。

【請求項 4 4】

前記ポリペプチドを放射性核種，蛍光標識，酵素，サイトカインおよび成長抑制物質から成る部類から選択した検出可能物質に複合したものとすることを特徴とする前記請求項 4 0 に記載の使用法。

10

【請求項 4 5】

前記検出可能物質を前記細胞または組織試料の細胞の増殖を抑制することが出来るものとすることを特徴とする前記請求項 4 4 に記載の使用法。

【請求項 4 6】

前記ポリペプチドをタンパク質精製標識に接合したことを特徴とする前記請求項 4 4 に記載の使用法。

【請求項 4 7】

前記タンパク質精製標識を割ることが可能のものとしたことを特徴とする前記請求項 4 6 に記載の使用法。

【請求項 4 8】

20

前記精製ポリペプチドを前記細胞または組織試料に前記細胞のリピド或は前記組織試料の細胞のリピドとを結合させることを特徴とする請求項 1，2，3，4，5，6，18，19，20または21の前記精製ポリペプチドと、細胞または組織試料と接触する段階から成る前記方法を哺乳動物の増殖性障害を処理する方法に関し前記請求項 1，2，3，4，5，6，17，18，19または20に記載の精製ポリペプチドを以てすることを特徴とする使用法。

【請求項 4 9】

前記ポリペプチドを抗体とすることを特徴とする前記請求項 4 8 の使用法。

【請求項 5 0】

前記増殖障害が肺の腺癌，扁平細胞肺癌腫，腸型胃癌，拡散型胃癌，結腸の腺癌，前立腺の腺癌，食道の扁平細胞癌腫，食道の腺癌，胸の小葉癌，胸の管癌，膵臓の腺癌，卵巣の腺癌および子宮の腺癌であることを特徴とする前記請求項 4 8 の使用法。

30

【請求項 5 1】

前記ポリペプチドを抗体とすることを特徴とする前記請求項 4 8 の使用法。

【請求項 5 2】

前記ポリペプチドを放射性核種，蛍光標識，酵素，細胞毒，サイトカインおよび成長抑制物質から成る部類より選択した検出をすることが出来る物質に抱合されていることを特徴とする前記請求項 4 8 に記載の使用法。

【請求項 5 3】

前記検出することの出来る物質を前記細胞または組織試料の細胞増殖を抑制することが出来るものとすることを特徴とする前記請求項 5 2 に記載の使用法。

40

【請求項 5 4】

前記ポリペプチドをタンパク質精製標識が共役されるようにしたことを特徴とする前記請求項 5 2 に記載の使用法。

【請求項 5 5】

前記タンパク質精製標識が分割することが出来るものであることを特徴とする前記請求項 5 4 に記載の使用法。

【請求項 5 6】

前記精製ポリペプチドが前記細胞または組織試料と結合することによって、前記細胞または組織試料を枯死させるように誘導する結果にする前記請求項 1，2，3，4，5，6

50

、 17、18、19または20の精製ポリペプチドを細胞または組織試料と接触させる手段から成るものとする哺乳動物についての増殖する障害を処理する方法に前記請求項1、2、3、4、5、6、17、18、19または20の精製ポリペプチドを用いることを特徴とする精製ポリペプチドの用法。

【請求項57】

前記哺乳動物をヒトとすることを特徴とする前記請求項56に記載の使用法。

【請求項58】

前記増殖の障害を肺の腺癌、扁平細胞肺癌腫、腸型胃癌、拡散型胃癌、結腸の腺癌、前立腺の腺癌、食道の扁平細胞癌腫、食道の腺癌、胸の小葉癌、胸の管癌、脾臓の腺癌、卵巣の腺癌および子宮の腺癌とすることを特徴とする前記請求項56に記載の使用法。

10

【請求項59】

前記ポリペプチドを抗体とすることを特徴とする前記請求項56に記載の使用法。

【請求項60】

前記ポリペプチドを放射性核種、蛍光標識、酵素、細胞毒、サイトカインおよび成長抑制物質から成る部類より選択することが出来る物質に抱合されていることを特徴とする前記請求項56に記載の使用法。

【請求項61】

前記検出可能物質を前記細胞または組織試料の枯死を誘導することが出来るものとすることを特徴とする前記請求項60に記載の使用法。

【請求項62】

前記ポリペプチドがタンパク質精製標識に結合されていることを特徴とする前記請求項60に記載の使用法。

20

【請求項63】

前記タンパク質精製標識を分割可能のものとすることを特徴とする前記請求項62に記載の使用法。

【請求項64】

細胞の増殖を抑制する薬剤を製造するための製薬上許容することが出来る保菌者に用いることを特徴とする前記請求項1、2、3、4、5、6、17、18、19または20のいずれかの1項に記載した精製ポリペプチド。

【請求項65】

リピドの細胞内の滞留を誘引する薬剤を製造するために製薬上許容することが出来る保菌者に与える前記請求項1、2、3、4、5、6、17、18、19または20のいずれかの1項に記載した精製ポリペプチド。

30

【請求項66】

細胞の枯死を招く薬物の製造のために製薬上許容することが出来ることを特徴とする前記請求項1、2、3、4、5、6、17、18、19または20のいずれかの1項に記載の精製ポリペプチド。

【請求項67】

細胞の増殖を抑制し、リピドの細胞内の蓄積を誘導し、そして細胞の枯死を誘導する製薬上許容することの出来る保菌者に与える前記請求項1、2、3、4、5、6、17、18、19或は20のいずれかの1項に記載の精製ポリペプチド。

40

【請求項68】

前記請求項1、2、3、4、5、6、17、18、19または20のいずれかの1項に記載の精製ポリペプチドから成ることを特徴とする診断用薬。

【請求項69】

SEQ ID NO: 2または4の配列から成る隔離核酸分子。

【請求項70】

前記請求項69に記載の核酸から成るベクター。

【請求項71】

前記請求項70のベクターから成る細胞。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

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

【0002】

医療分野における最近の進歩によって、癌の患者の生存率が極めて改善されてはいるが、癌に関連する疾病に基づく死亡者の多くの方々を腫瘍の早期診断によって阻止しなければならないのである。したがって、最初に診断をした際に、患者で恐怖に陥いられている方々は、既に疾病の最終段階に達しているのである。

10

【0003】

女性たちの凡そ75%は病勢が進んだ段階（第Ⅲ期または第Ⅳ期）に達していると、卵巢癌の症状が漠然となり、表立たなくなってしまう。極めて積極的な外科的の治療手段と新規な化学療法であっても、進行した段階に入っている卵巢の癌をわずらっている女性の生存年数は約15%が5年を超えることがないというのが、過去30年以上、変わることが無いのである。これを言い換えるならば、卵巢に癌が出来ていると診断された（第1期）の女性の凡そ90%は5年間生存できるというわけである。

【0004】

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

20

【0005】

ここにおいて、この発明の概要について説明する。即ち、腫瘍性の細胞に関する抗原決定基の特異性に反応するSAM-6と呼ぶポリペプチドを発見したのである。このポリペプチドは極めて優秀な診断上の手段となるものであるばかりか、細胞の増殖を抑え、細胞に結合している腫瘍性の細胞類をアポトーシス、つまり枯死させるのである。腫瘍性の疾患の治療に特有の結果をもたらすのである。

【0006】

この発明は腫瘍の診断や治療に利用することができるモノクローナルの抗体類であるポリペプチドを主体とするものである。したがって、この発明の第一の態様においては、腫瘍細胞に結合する精製ポリペプチドを特色とするもので、そのポリペプチドはアミノ酸配列順がSEQ ID NO: 1とSEQ ID NO: 3と同一であって、そのポリペプチドは特にBXP C-3（ATCC受け入れ番号No. CRL-1687）細胞23132/87（DSMZ受け入れ番号No. ACC201）細胞、COLO-206F（DSMZ受け入れ番号No. ACC21）細胞、COLO-699（DSMZ受け入れ番号No. ACC196）細胞とLOU-NH91（DSMZ受け入れ番号No. ACC393）細胞であって、腫瘍性の細胞には結合しない。

30

【0007】

この発明の第二の態様では、この発明は腫瘍性の細胞に結合している精製ポリペプチドを特色とするものであって、このポリペプチドはSEQ ID NO: 1とSEQ ID NO: 3の順序と殆んど同一のアミノ酸配列を備えている。そして前記ポリペプチドは、特に新生物細胞に結合する。BXP C-3（ATCC受け入れ番号No. CRL-1687）細胞23132/87（DSMZ受け入れ番号No. ACC201）細胞、COLO-206F（DSMZ受け入れ番号No. ACC21）細胞、COLO-699（DSMZ受け入れ番号No. ACC196）細胞とLOU-NH91（DSMZ受け入れ番号No. ACC393）細胞とに結合し、非新生物の細胞には結合しない。そして、前記腫瘍性の細胞は、肺の腺癌，扁平細胞肺癌，腸管型胃癌，散在性の胃癌，結腸の腺癌，前立腺の腺癌，食道の扁平細胞癌腫，食道の腺癌，胸部の消化管小葉癌腫，胸部の管の癌腫，膵臓の腺癌，卵巢の腺癌および子宮の腺癌である。

40

50

【 0 0 0 8 】

この発明の第三の態様では、この発明は腫瘍性の細胞に結合している精製ポリペプチドに特徴を有する。前記ポリペプチドは S E Q I D N O : 1 と S E Q I D N O : 3 の配列に殆んど一致するアミノ酸配列を具備し、前記ポリペプチドは肺の腺癌、扁平細胞肺癌、腸管型胃の腺癌、散在性胃癌、結腸の腺癌、前立腺の腺癌、食道の扁平癌腫、食道の腺癌、乳房の無定形状癌腫、乳房の管の癌腫、膵臓の腺癌、卵巣の腺癌および子宮の腺癌で非新生物の細胞でないものである。

【 0 0 0 9 】

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

10

【 0 0 1 0 】

この発明の前記最初の三つの実施態様のうちの第 2 番目の好ましい態様においては、ポリペプチドは低濃度のリボプロテイン (L D L) および / または酸化した低濃度のリボプロテイン (o x L D L) に結合し、そしてまた極めて低濃度のリボプロテイン (V L D L) に結合し、腫瘍性の細胞に結合すると、脂質が細胞内に蓄積するようになるが非新生物の細胞に脂質の細胞内蓄積を招くことはない。

【 0 0 1 1 】

この発明の前記最初の三つの実施態様の第 3 番目の好ましい実施態様においては、ポリペプチドは腫瘍性の細胞のアポトーシスを誘導し、これを結合するが、非新生物の細胞を誘導することはない。

20

【 0 0 1 2 】

この発明の前記最初の三つの態様の第 4 番目の好ましい実施態様においては、ポリペプチドはその抗体または機能的なフラグメントを包含する。例えば機能的なフラグメントは V_L , V_H , F_V , F_C , F_{ab} , F_{ab}' および $F(a b')_2$ から成っている群中から選択することができる。更に、機能的なフラグメントには S E Q I D N O : 1 および / または 3 の配列と同様であるか、或は S E Q I D N O : 1 および / または 3 の配列のフラグメントを含ませることができる。

【 0 0 1 3 】

この発明の前記最初の三つの態様の第 5 番目の好ましい実施態様においては、ポリペプチド核酸配列は L 鎖の可変領域 (V_L) の S E Q I D N O : 2 のヌクレオチド 6 7 - 9 9 (C D R 1) , 1 4 5 - 1 6 5 (C D R 2) および 2 6 2 - 2 8 8 (C D R 3) と同様の核酸配列から成っている。しかし、ポリペプチド核酸配列の相補性の決定的領域 (C D R s) は重鎖の可変領域 (V_H) のヌクレオチド 9 1 - 1 0 5 (C D R 1) , 1 4 8 - 1 9 8 (C D R 2) および S E Q I D N O : 4 の 2 9 5 - 3 3 0 (C D R 3) と全く同じである。

30

【 0 0 1 4 】

この発明の前記第 4 番目の態様はアミノ酸配列 S E Q I D N O : 1 またはアミノ酸配列 S E Q I D N O : 3 を具備する精製ポリペプチドを特性とする。

【 0 0 1 5 】

第 5 番目の態様においては、この発明は精製ポリペプチドは S E Q I D N O : 1 および 3 のアミノ酸配列を包含している。

40

【 0 0 1 6 】

この発明の前記最初の第 5 番目の態様の最初の実施態様では、ポリペプチド酸配列の相補性決定領域 (C D R s) が軽鎖 (V_L) の S E Q I D N O : 1 の可変領域のアミノ酸配列 S e r - G l y - A s p - L y s - L e u - G l y - A s p - L y s - T y r - A l a - C y s (C D R 1) と、 G l n - A s p - S e r - L y s - A r g - P r o - S e r (C D R 2) と、 G l n - A l a - T r p - A s p - S e r - S e r - I I e - V a l - V a l (C D R 3) と殆んど同じである。しかし、ポリペプチドアミノ酸配列の相補性決定領域 (C D R s) は重鎖 (V_H) の S E Q I D N O : 3 の可変領域のアミノ酸配列 S e r - T y r - A l a - M e t - H i s (C D R 1) , V a l - I I e - S e r - T

50

y r - A s p - G l y - S e r - A s n - L y s - T y r - T y r - A l a - A s p - S e r - V a l - L y s - G l y (C D R 2) と A s p - A r g - L e u - A l a - V a l - A l a - G l y - L y s - T h r - P h e - A s p - T y r (C D R 3) と殆んど同じである。

【 0 0 1 7 】

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

【 0 0 1 8 】

第 6 番目の態様では、この発明は第 1 番目の態様のポリペプチドを表わす細胞を特徴とし、第 9 番目の態様では、第 3 番目の態様のポリペプチドを表わしている。

10

【 0 0 1 9 】

この発明の第 7 番目の態様においては、アミノ酸配列 S E Q I D N O : 1 に等しい配列から成っているポリペプチドを示す細胞を特徴とするものである。

【 0 0 2 0 】

この発明の第 8 番目の態様においては、アミノ酸配列 S E Q I D N O : 3 に等しい配列から成っているポリペプチドを示す細胞を特徴とするものである。

【 0 0 2 1 】

この発明の第 9 番目の態様においては、アミノ酸配列 S E Q I D N O : 1 または 3 に等しい配列から成っているポリペプチドを示す細胞を特徴としており、この態様に関する好ましい実施例においては、ポリペプチドは S E Q I D N O : 1 または 3 或は S E Q I D N O : 1 と 3 との両者の配列を含んでいる。

20

【 0 0 2 2 】

第 1 0 番目の態様においては、この発明は前記第 6 番目の態様による細胞を生成する方法を特徴としている。この方法は次の段階から成っている。即ち、(a) リンパ球を異形骨髓腫細胞で溶融させる条件下で接触してハイブリドーマを融解し、(b) 前記ハイブリドーマが腫瘍細胞の増殖を抑制するか否かを決定するが、非新生物細胞の増殖を抑制せず、(c) B X P C - 3 (A T C C 受け入れ番号 N o . C R L - 1 6 8 7) , 2 3 1 3 2 / 8 7 (D S M Z 受け入れ番号 N o . A C C 2 0 1) , C O L O - 2 0 6 F (D S M Z 受け入れ番号 N o . A C C 2 1) , C O L O - 6 9 9 (D S M Z 受け入れ番号 N o . A C C 1 9 6) および L O U - N H 9 1 (D S M Z 受け入れ番号 N o . A C C 3 9 3) の細胞の少くとも一種に結合していて、非腫瘍性の細胞には結合しない。

30

【 0 0 2 3 】

第 1 1 番目の態様の特徴は前記第 7 番目の態様の細胞を発生する方法に関するものである。この方法は次の諸段階、即ち、(a) 異形骨髓腫細胞でリンパ球を融解し、その融解によってハイブリドーマ、即ち融合雑種腫瘍細胞を融解し、(b) 結合している腫瘍細胞の脂質の細胞内の蓄積を招くポリペプチドを発生するが、非腫瘍細胞に脂質の細胞内の蓄積は招くことがなく、(c) ハイブリドーマが、少くとも B X P C - 3 (A T C C 受け入れ番号 N o . C R L - 1 6 8 7) , 2 3 1 3 2 / 8 7 (D S M Z 受け入れ番号 N o . A C C 2 0 1) , C O L O - 2 0 6 F (D S M Z 受け入れ番号 N o . A C C 2 1) , C O L O - 6 9 9 (D S M Z 受け入れ番号 N o . A C C 1 9 6) および L O U - N H 9 1 (D S M Z 受け入れ番号 N o . A C C 3 9 3) 細胞の少くとも一種の細胞と、特に結合し、非新生物の細胞には結合しないポリペプチドを生成するか否かを決定する。

40

【 0 0 2 4 】

この発明の第 1 2 番目の態様では、哺乳動物、例えばヒトの腫瘍を診断する方法に関するこの発明の最初の 5 つの態様のいずれかの態様の精製ポリペプチドを用いるものを特徴とする。この方法には次に述べる段階がある。即ち、(a) この発明の最初の第 1 3 番目の態様中のいずれかの一つの態様の精製ポリペプチドを哺乳動物の細胞または組織試料と接触し、そして(b) 精製ポリペプチドが細胞または組織試料に結合するか否かを検出するものであって、精製ポリペプチドに結合すれば、その哺乳動物は腫瘍を有することを指示するものである。そして(c) ハイブリドーマが、少なくとも B X P C - 3 (A T C C

50

受け入れ番号 No. CRL - 1687), 23132/87 (DSMZ 受け入れ番号 No. ACC201), COLO - 206F (DSMZ 受け入れ番号 No. ACC21), COLO - 699 (DSMZ 受け入れ番号 No. ACC196) および LOU - NH91 (DSMZ 受け入れ番号 No. ACC393) 細胞であり、非腫瘍形成細胞でないか否かを決定する。

【0025】

この発明の第13番目の好ましい態様では、腫瘍は肺の腺癌、扁平細胞肺癌、腸型胃癌、散在性胃癌、結腸の癌、前立腺の癌、食道の鱗状細胞癌腫、食道の癌、胸部の小葉の癌腫、胸部の管の癌腫、膵臓の腺癌、卵巣の腺癌、または子宮の腺癌である。この態様の更に好ましい態様においては、ポリペプチドは抗体またはポリペプチドを、放射性核種、蛍光のマーカ、酵素、細胞毒素、サイトカインおよび成長抑制物質から成る種類の中から選択された検出能物質に結合することができる。この態様における更に好ましい態様においては、ポリペプチドは抗体であるか、或は放射性核種、蛍光標識、酵素、細胞毒素、サイトカイン及び成長抑制物質から成る群の中から選択された検出物質に配合されている。更に、ポリペプチドはタンパク質精製標識例えば、裂開性タンパク質精製標識に接合することができる。

10

【0026】

この発明の第14番目の態様においては、この発明は、その最初に述べた5種類の態様中の、いずれかの一つの態様の精製ポリペプチドを哺乳動物、例えばヒトの増殖性障害を処理する方法に使用することを特徴とするものである。この方法には、細胞試料を前記態様の最初の7種類のうちの、いずれかの一つの精製ポリペプチドと接触される段階を含んでいて、細胞に精製ポリペプチドを結合することによって、その細胞中の倍数性が減する効果がある。

20

【0027】

この発明の第14番目の態様の中の好ましい複数の実施態様において、増殖性異常症は肺の腺癌、扁平肺癌腫、本能型胃癌、散在性型胃癌、結腸の腺癌、前立腺の腺癌、食道の扁平細胞癌腫、食道の腺癌、乳房の小葉の癌、胸の管の癌腫、膵臓の腺癌、卵巣の腺癌、そして子宮の腺癌である。この実施態様の好ましい態様は、更に、抗体或はポリペプチドが放射性核種、蛍光の標識、酵素、細胞毒素、サイトカインおよび成長抑制物質から成る部類中から選択された検出物質に随伴している。望ましい検出物質は細胞の枯死を招くものである。更に、ポリペプチドはタンパク質精製付端、例えば分割することの出来るタンパク質精製タグに結合させることが出来る。

30

【0028】

第15番目の態様において、この発明は哺乳動物、例えばヒトの増殖性障害を処理する方法に、その最初の五つの態様のいずれかの精製ポリペプチドを使用することにある。この方法は細胞を、この発明の最初の七つの態様のいずれかの精製ポリペプチドと接触させる段階を必要としている。

【0029】

この発明の第16番目の望ましい態様では、増殖性障害は胃の腺癌、結腸直腸の腺癌、扁平細胞肺癌、肺腺癌、食道の扁平細胞癌腫、膵臓の腺癌、膀胱の尿路癌、腎臓の腎性細胞の尿路上皮癌、腎臓の腎性細胞の腎性細胞癌腫、前立腺の腺癌、乳房の管路癌腫、乳房の小葉癌腫、卵巣の腺癌、子宮内膜の腺癌、そして子宮の腺癌である。なお、この態様における更に好ましい実施態様は、ポリペプチドが抗体であるか、或はポリペプチドが放射性核種、蛍光の標識、酵素、細胞親和性、サイトカインおよび成長抑制物質から成る部類中から選択された検出能物質に結合されている。望ましいことには、検出能物質は細胞の抑制細胞増殖を行うことが出来るものであることである。更に、ポリペプチドはタンパク質精製標識、例えば裂けることが出来るタンパク質精製標識に共役させることが出来る。

40

【0030】

第17番目の態様において、この発明は哺乳類、例えばヒトの増殖性障害を治療する方法に関する、この発明の前記最初の5つの態様のいずれかの一種の精製ポリペプチドを用

50

いることを特徴とするものである。この方法は細胞を、この発明の最初に述べた七種類の態様のうちの任意の精製ポリペプチドと細胞とを接触する手段を包含している。そこで、精製ポリペプチドを細胞と結合すると、前記細胞を枯死させる。

【0031】

この発明の第18番目の好ましい態様においては、増殖性疾患は胃癌、結腸大腸、腸の腺癌、扁平細胞肺癌、肺の腺癌、食道の扁平細胞癌、膵臓の腺癌、膀胱の尿路上皮癌、腎臓の腎性細胞癌、前立腺の腺癌、胸部の管の癌、卵巣の腺癌、子宮内膜の腺癌、子宮の腺癌である。この第18番目の態様に関する更に好ましい態様はポリペプチドが抗体であるか、或はポリペプチドは放射性核種、蛍光の標識、酵素、細胞毒素、サイトカイン、そして成長抑制因子から成るものから選択された検出能物質に結合されている。好ましくは、検出能物質は細胞の抑制細胞増殖が出来るものであることである。更に、ポリペプチドはタンパク精製標識、例えば、分割をすることの出来るタンパク質精製標識に随伴することが出来る。

10

【0032】

この発明の第19番目の態様では、細胞の増殖を阻止する薬剤の生産に関して薬学医学的に許容できるキャリアに、この発明の前記最初の五つの態様のいずれかの精製ポリペプチドを含有する薬剤でヒトの体内の腫瘍性細胞を処理することを特徴とするのである。

【0033】

この発明の第20番目の態様においては、ヒトの体内の腫瘍性の細胞を、脂質の無傷の蓄積を誘導する薬剤の生産に当って、薬学医学上許容することが出来る担体を、この発明の前記最初に述べた5つの態様のうちのそれぞれの精製ポリペプチドを含有する医薬によりヒトの体内の腫瘍性の細胞を処理することを特徴とするのである。

20

【0034】

この発明の第21番目の態様においては、アポトシス（細胞消滅）を行う薬剤を製造する薬学医学上許容することの出来るキャリアに関するこの発明の前記最初の五つの態様のいずれかの精製ポリペプチドを含有する薬剤を用いてヒトの体内の腫瘍性の細胞を処理することを特徴とするのである。

【0035】

この発明の第22番目の態様は、ヒトの体内の腫瘍性の細胞のすべての増殖を阻止し、脂質の蓄積を招き、アポトーシス（細胞の枯死）を招来させる薬剤の製造のための薬学医学について許容することの出来るキャリアに関する前記最初に述べた5つの態様のいずれもの精製ポリペプチドを含有する薬剤を用いてヒトの体内の腫瘍性の細胞を処理することを特徴とするものである。

30

【0036】

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

【0037】

この発明の第24番目の態様においては、SEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 4の配列を含む分離核酸分子を特徴とするものである。

【0038】

この発明の第25番目の態様においては、この発明は仲介物（ベクター）、例えばプラスミドまたはウイルス性の表徴ベクターであって、この発明の第24番目の態様の核酸分子を含有するものを特徴とするものである。

40

【0039】

定義

「検出可能物質」とは検出を促進する診断上の物質に結合されている化合物のことである。このような「検出可能物質」は診断上の物質に結合されている共有結合または非共有結合のものである。更に、結合は直接または間接の結合である。「検出可能物質」の例を挙げると、タンパク質浄化標識、細胞親和性、酸素分泌、常磁性のラベル、酵素原質、補助因子、酵素抑制物質、色素、放射性核種、化学ルミネッセントラベル、蛍光の標識、成

50

長抑制物質，細胞分裂，抗体，ビオチンが挙げられる。

【0040】

「診断物質」とは、この明細書に記載する効力検定、並に当該技術において標準である他の手段のいずれかを利用して腫瘍性の細胞を検出するのに用いることが出来る化合物のことである。

「診断物質」の例を挙げると、次のものがある。次の細胞、即ち、BXP C - 3 (ATCC 受け入れ番号 CRL - 1687)，23132 / 87 (DSMZ 受け入れ番号 ACC 201)，COLO - 206 F (DSMZ 受け入れ番号 ACC 21)，COLO - 699 (DSMZ 受け入れ番号 ACC 196) または LOU - NH91 (DSMZ 受け入れ番号 ACC 393) で、しかも非腫瘍性細胞でないもののうちの少くとも一つに特に結合している抗体である。更に、「診断物質」は抑制細胞の増殖を抑制し、また、それが腫瘍性の細胞に結合する時にだけで、腫瘍性の細胞でなければ、その増殖を抑えない。

10

【0041】

「診断上の薬品」で検出できる腫瘍性の細胞の例を挙げると、肺の腺癌，扁平細胞肺癌，腸管型胃癌，散在性型胃癌，結腸の腺癌，前立腺の腺癌，食道の鱗状細胞の癌，食道の腺癌，胸部の小葉癌，胸部の管の癌，膵臓の腺癌，卵巣の腺癌或は子宮の腺癌がある。更に、「診断上の薬品」とは、例えばペプチド，ポリペプチド，合成有機分子，自然発生有機分子，核酸分子およびそれらの成分で、同様に一種乃至数種の検出物質を共有し、または診断上の薬品に連鎖した一種もしくは数種の検出物質を共有するもの、または非共有連鎖物質を含む。

20

【0042】

前記ポリペプチドに関連して使用した「機能的断片」とは、等身 (full-length) ポリペプチドの少くとも生物学的活動度を保持する断片をいう。この生物学的活動度の例を挙げると、特に抗原に結合する能力を備え、アポトシスおよび/または細胞増殖抑制能力を備えている。これらの生物学的活動度は、例えば、この発明において述べる効力検定手段のいずれかを利用して行うことが出来る。

【0043】

抗体の機能的な断片の例を挙げると、 V_L ， V_H ， F_v ， F_c ， Fab ， Fab' または $F(ab')_2$ 断片である。(例えばヒューストン (Houston) 外著、細胞生体物理学 22: 189 - 224, 1993; およびハーロウ (Harlow) およびレーン (Lane) 著「抗体」(Antibodies): 研究所マニュアル, コールド, スプリング, ハーバー, ラボラトリー (A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory), 1988)。好ましくは、「機能的な断片」は、例えば SEQ ID NO: 1 または 3 のアミノ酸配列の 5, 10, 15, 20, 15, 30, 50, 75 または 100 近接アミノ酸の断片を含有するか、或は SEQ ID NO: 1 または 3 のアミノ酸配列の断片に等しいアミノ酸配列のものである。更に好ましい態様においては、「機能的な断片」は SEQ ID NO: 1 または 3 の配列の断片に等しい。この種の「機能的な断片」は SEQ ID NO: 1 または 3 の 5, 10, 15, 20, 15, 30, 50, 75 または 100 近接アミノ酸を含有するか、SEQ ID NO: 1 または 3 の総てのアミノ酸配列とすることが出来る。SEQ ID NO: 1 または 3 の 5, 10, 15, 20, 15, 30, 50, 75 または 100 の近接アミノ酸を含有することができる。

30

40

【0044】

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

アレンドロ A シェファアー, (Alejandro A Schäffer), ジングイ ツァング (Jinghui Zhang), ツェング ツァング (Zheng Zhang), ウェブ ミラー (Webb Miller), 及びダビッド J. リップマン (David J. Lipman) (1997年著)と、「グラブト BLAST及びPSI-BLAST: 「タンパク質データベース探索用プログラムの新時代」 核酸 Res. 25; 3389-3402. (NCBIデータベース)。

【0045】

この発明で用いている「ハイブリドーマ」とは、例えば、骨髄腫のような腫瘍性の細胞で活性化されたリンパ球などの正常な細胞の溶融によって作り出された細胞である。少くとも2種類の細胞の融合によって生じたハイブリッド細胞は免疫学的活性化細胞によって生成したものと同様の単クローン抗体或はT細胞生成物を生成する。更に、これらの細胞は、腫瘍性の親と同様に不滅である。

【0046】

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

【0047】

この発明の明細書で記載の「脂質の結合」とは脂質、特に低濃度リボプロテイン (LDL) および/またはoxLDLとポリペプチドとの相互作用のことで、これは腫瘍性の細胞の細胞周期を激しく干渉するのである。その干渉は最終的にはリピドの蓄積を招くのである。ポリペプチドが腫瘍性の細胞またはホイター (wheater) と相互に作用して複合体を形成する脂質と相互に作用するか、またはポリペプチドが腫瘍性の細胞の表面にレセプターと共に直接に相互に作用するかは不明である。

【0048】

抗体であるポリペプチドは、その単量体で、またはその五量体の形で活動する。

【0049】

ここで述べた「リピドの細胞内の蓄積」とは細胞内のリピドの濃度の増加、特に、その種の細胞のリピドの通常の濃度に較べて細胞内のリピド、特に低濃度のリボタンパク質 (LDL) および/またはoxLDLの濃度の増加をいう。LDLは精製されたポリペプチドによって培養された細胞中に増加したコレステロールエステルとトリグリセリドをクロマトグラフィー分析することによって形成する細胞内に豊富になった細胞内のコレステロール血症とトリグリセリドをクロマトグラフィー法で分析することによって細胞内に濃縮された脂質であることが判る。専らLDLだけが、これらの内容を形成する。その結果、細胞内の脂質の蓄積によって細胞を自滅させる。即ち、腫瘍細胞の「リポプトシス (Lipoptosis)」とする細胞内の脂質の蓄積に導くのである。

【0050】

細胞内の脂質の蓄積は、次に記載の文献に記載の蛍光染色法のスーダン (Sudan) IIIの方法 (グリーンズパン, P.), (Greenspan P.), メイヤー (M

10

20

30

40

50

ayer), E. P., 及び D. ナイル レッド (Fowler D. Nile Red) の細胞内リピド小滴. J. セル, バイオル (Biol), 100, 965-973, 1985) に記載されている染色法などを利用して分析し視覚化することができる。

【0051】

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

10

【0052】

この発明で使用されている「腫瘍性の細胞」とは、細胞分割を行う細胞のことで、不適当な状態の中で、細胞分割を行うものではない。例えば、「腫瘍性細胞」とは、該当する非腫瘍性細胞は細胞分割をすることなく、その代りに「腫瘍性細胞」は通常の細胞周期検査制御に反応するものではない。

20

【0053】

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

【0054】

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

30

40

【0055】

ポリペプチド、例えば抗体について用いられる物質について、「特に認識」することは、粒状のタンパク質、例えば抗原が、それと等量の別種のタンパク質に比較して、その親和力が優れているということである。例えば、抗体、例えば BXP C-3 (ATCC 受け入れ番号 CRL-1687), 23132/87 (DSMZ 受け入れ番号 ACC201), COLO-206F (DSMZ 受け入れ番号 ACC21), COLO-699 (DSMZ 受け入れ番号 ACC196) または LOU-NH91 (DSMZ 受け入れ番号 ACC393)、または BXP C-3 (ATCC 受け入れ番号 CRL-1687) 細胞で、好まし

50

くは、その抗原について、それと異なる他の抗体に関連する抗原を具備する前記の抗体と等量のものよりも、少くとも2 - ヒダ，5 - ヒダ，10 - ヒダ，30 - ヒダまたは100 - ヒダ大きい。ポリペプチドが他のポリペプチドと結合することは、ここに述べたことと、技術上の標準的な手段、例えば、ウエスタン (Western) 分析ELISA、または免疫沈降などの多くの方法で調べることが出来る。

【0056】

「実質的に同一」とは、基準となるアミノ酸 (例えばSEQ ID NO: 1または3) 或は核酸の配列 (例えば、SEQ ID NO: 2または4) にポリペプチドまたは核酸が少くとも75%，80%，85%，または90%類似しているということである。望ましい態様にあつては、ポリペプチド或は核酸配列が基準となるアミノ酸または核酸配列に少くとも95%，98%，99%或は100%類似しているということである。ポリペプチドについては、比較する配列の長さは通常、少くとも5，10または15アミノ酸で、好ましくは少くとも20または25近接アミノ酸である。更に望ましい態様では、比較配列の長さは少くとも30，50，75，90，95或は100隣接アミノ酸或は標準の長さのアミノ酸配列である。核酸については、比較配列の長さは、一般に、少くとも15，30または45近接ヌクレオチドで、望ましくは少くとも60近接ヌクレオチドである。更に望ましい態様にあつては、比較配列の長さは少くとも75，150，225，270，285或は300近接ヌクレオチド或は全長ヌクレオチド配列である。

【0057】

配列識別はデフォルト設定に関する配列分析ソフトウェアを利用して測定する。(例えば、アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 マディソン，WI 53705ユニバーシティ アベニュー1710，ユニバーシティ オブ ウィスコンシン バイオテクノロジー センター ジェネティクス コンピューター グループ (the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705) のセクエンス アナライジーズ ソフトウェア パッケージ (Sequence Analysis Software Package))。

【0058】

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

【0059】

多数の配列は、これをドイツのヨーロッパ分子生物研究所 (European Molecular Biology Laboratory) とイギリス，ケンブリッジのヨーロッパ無機生物学研究所 (European Bioinformatics Institute) のジュリーD・トンプソン (Julie D Thompson) とトビイ・ギブソン (Toby Gibson) とデズモンド ヒギンズ (Desmond Higgins) によって作成されたクラスタル (Clustal) W (1.4) プログラムで、ペア式整列モード (pairwise alignment mode) を「スロー (slow)」に設定し、10.0の開放ギャップ ペナルティ (open gap penalty) 0.1を含む対をなす整列モードを設定し、「ブローサム」 (blossum) と類似するマトリックスを設定する。更に、多重アライメントパラメータが10.0の開放ギャップ ペナルティ (open gap penalty)、0.1の延長ギャップ ペナルティ (extend gap penalty) を含むことが出来、同様に類似するマトリックスを「ブローサム」 (blossum)，40%，分岐，間隙距離8に設定する。

【0060】

10

20

30

40

50

「精製した」または「分離した」とは、自然に随伴している別の成分から離すことの意味である。一般的に、因子は、これが重量で少くとも50%の場合には、タンパク質、抗体および天然に結合されている有機分子が無く、核酸分子の配列に通常の通り、位置している核酸配列とは関係していない。遺伝因子は少くとも、重量で75%、更に好ましくは少くとも、重量で90%、より好ましくは重量で少くとも99%、純粋とする。この純粋な要素は化学的合成、天然資源から要素の分離、または要素を自然には生成しない組換え増殖細胞から製造する。タンパク質、小胞および細胞小器官は標準とする技術、例えばオースベル(Ausbel)外の記載の技術(カレント プロトコルス イン モレキュラ バイオロジー(Current Protocols in Molecular Biology), ウィレイ インターサイエンス社(Wiley Interscience), ニューヨーク, 2001発行を参照。その因子は出発物質が純粋な場合には、少なくとも2.5あるいは10倍で、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法, カラムクロマトグラフィー, 光学不透明度, HPLC分析, またはウエスタン(Western)分析(オースベル氏他著「分子生物学」ニューヨーク, 2001)(Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001)を利用して測定する。精製の望ましい方法は、免疫沈降, コラムクロマトグラフィー, つまり免疫沈降クロマトグラフィーと、ニッケルアフィニティカラム, 磁気数珠状免疫清浄化, 及びプレート・バウンド抗体によるパンニングである。

10

20

【0061】

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

【0062】

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

30

【0063】

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

40

50

めて顕著な細胞部の伸長部で更に分裂される。細胞の喪失、細胞の接触および付着は48時間後に、はっきりと観察される。(細胞の数の減少は癒着による喪失の結果として溶液中に入り込んだ細胞に起因する。)

【0064】

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

【0065】

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

【0066】

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

【0067】

図7はナイル赤染色実験の結果を示す。細胞のリポドもまた蛍光染料ナイル赤で染色することによって視覚化することができる。ここにおいて、特定の波長(26, 27)で調べたとき、無極或は中性脂質染料黄金および有極リポド染色ダークレッドであった。胃癌

細胞 (2 3 1 3 2 / 8 7) を抗体 S A M - 6 で 4 8 時間培養して脂質の蓄積を研究した。蛍光は中性リピドについて 4 8 8 n m にて測定され、極性リピドについて 5 4 3 n m にて測定された。図 7 A と D とは無極の中性リピドに関する黄色の染色を示し、図 7 B と E とは極性リピドに関する赤色の染色を示し、図 7 C と F とは両方の重畳を示す。予期した通り、S A M - 6 処理細胞の中性リピドに関する強度の黄色蛍光染色は 4 8 時間後に見ることが出来る (図 7 D) 。多量の膜タンパクを示す対照 (図 7 B) に比較して極脂質について染色された S A M - 6 処理細胞に関して増加が見受けられる (図 7 E) 。抗体 S A M - 6 は枯死を増加するので、多量の極脂質が更に多くの膜小胞の形成を招く。即ち、細胞の自滅体を招くのである。図 7 C と F に見られるように、極のリピドは赤色を呈し、明瞭でないリピドは黄色と若干がオレンジ色を呈すると思われる。ナイル赤の赤色蛍光性は極めて激しく、黄金色蛍光測定になる可能性があり、明確な差別が中性のものと極性リピド染色との間にされることが出来る。これらの結果をすべて取り上げ、更に S A M - 6 抗体が癌細胞に中性リピドの滞留を招くものである。

【 0 0 6 8 】

図 8 A は o x L D L の量が C u S O ₄ を L D L の培養により増加していることを示す。しかし L D L が C u S O ₄ で培養されなくても、その酸化した形 (o x L D L) で L D L が可成り多量であることを示している。

【 0 0 6 9 】

図 8 B は o x L D L が S A M - 6 抗体の好ましい結合相手であることを示す。1 5 時間 C u S O ₄ で培養されたサンプルは 3 時間で培養したサンプルよりも多量の S A M - 6 抗体が結合している。同基準標本として、ヒトとは関係のない l g M (クロンプア l g M デイアノヴァ) (C h r o m p u r e l g M , D i a n o v a) を用いた。

【 0 0 7 0 】

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

【 0 0 7 1 】

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

【 0 0 7 2 】

図 1 0 A と 1 0 B とは S A M - 6 抗体または対照抗体で処理された腫瘍接種マウスを用いての生体内での実験の結果を示す。図 1 0 A によると、S A M - 6 で処理したマウスの腫瘍の平均重量は 9 6 . 2 グラムであり、対照抗体で処理したマウスの腫瘍の平均重量は 1 5 0 . 5 グラムであった。図 1 0 B は腫瘍の重量に該当する腫瘍の容積の分析を示す。S A M - 6 で処理したマウスの腫瘍の平均容積は 1 2 6 . 3 m m ³ で、これに対して対照抗体で処理したマウスの腫瘍の平均容積は 1 5 8 . 2 m m ³ である。

【 0 0 7 3 】

配列一覧表

配列一覧表にはアミノ酸配列 (S E Q I D N O : 1) (1) とヒト単クローン性の抗体 S A M - 6 の短鎖 (V _L) の可変領域の核酸配列 (S E Q I D N O : 2) (2) とを示す。

【 0 0 7 4 】

配列表 3 と 4 とはアミノ酸配列 (S E Q I D N O : 3) (3) と、ヒト単クローン抗体 S A M - 6 の長鎖 (V _H) の可変領域の核酸配列 (S E Q I D N O : 4) (4) とである。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 5 】

詳細な説明

この発明は抗体などのポリペプチド類と、腫瘍の処置と診断とにそれらを使用することを特徴とするものである。特に数多の癌として認められているヒト単クローン性の抗体（S A M - 6）を特徴とする。この単クローン性の抗体は、これら腫瘍を認識するだけでなく、細胞に結合したときに腫瘍性の細胞の自滅を導き、これら細胞の増殖を阻止し、また、これら両者の作用をするのである。更に、抗体（S A M - 6）は細胞自滅および/または細胞増殖の抑制を招く脂質の細胞内の蓄積をも誘導するのである。したがって、S A M - 6単クローン性の抗体或はその断片は、これらポリペプチドと相補的に結合される特異のものであり、これらポリペプチドによって認識される抗原の種であって、腫瘍を診断し、治療するための各種の方法に利用することが出来る。

10

【 0 0 7 6 】

抗体とポリペプチド

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

20

【 0 0 7 7 】

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

30

【 0 0 7 8 】

一般に、この発明のポリペプチドはB X P C - 3, 2 3 1 3 2 / 8 7, C O L O - 2 0 6 F, C O L D - 6 9 9 および L O U - N H 9 1 に結合する凡ゆる薬剤であるが、非腫瘍性の細胞には結合しない。ポリペプチドはヒト - モノクローナル抗体（例えば、S A M - 6）、或はその機能的断片などの抗体でも差支えない。全体的に見て、この発明のポリペプチドは腫瘍性の組織と腫瘍性の細胞との両者に専ら結合することが出来るのであるが非腫瘍性の組織または細胞には結合しない。ポリペプチドはまた、これが結合する腫瘍性の細胞の増殖を抑止することが出来るが、非腫瘍性の細胞の増殖を抑えることは無い。望ましいことに、ポリペプチドは細胞の枯死と非腫瘍性細胞の増殖とを誘起することが出来るけれども、非腫瘍性の細胞は、以上のようにすることは出来ない。それゆえ、ポリペプチドは哺乳動物の癌の検出、観察、および治療に極めて有用である。最新の発明の方法で取扱われている癌は、結腸直腸の癌、卵巣の癌、扁平細胞肺癌腫、小細胞肺癌腫、小房および管の乳癌、黒色腫、乳癌、肺癌、例えば肺腺癌、胃癌、膵臓癌、例えば膵臓腺癌、グリオーマ、ブドウ状肉腫、胃腸管系の癌、脳腫瘍、食道癌、例えば食道扁平細胞癌腫、胃癌、骨肉腫、線維肉腫、膀胱癌、前立腺癌、例えば摂護腺癌、腎臓癌、卵巣癌、睾丸の癌、子宮内膜の癌、頸部の癌、子宮の腺癌、ホジキン病（リンパ肉芽腫）、リンパ腫、および皮膚白血病である。これらのポリペプチドは肺の腺癌、扁平細胞肺癌腫、腸管型胃癌、散

40

50

在型胃癌，結腸の腺癌，前立腺の腺癌，食道の扁平細胞癌腫，食道の腺癌，胸の小葉癌，胸の腺癌，膵臓の腺癌，卵巣の腺癌、または子宮の腺癌には特に効果がある。

【0079】

製造法

この発明に基づくポリペプチドは、小規模で、また大規模で、或は営利目的の市場に対して、周知の方法で製造することが出来る。例えば、モノクローナル抗体、例えばSAM-6は、ハイブリドーマ細胞ラインで製造出来る。この種の細胞ラインは腫瘍、例えば胃癌，結腸癌腫または膵臓癌腫などにかかっている患者、つまり異形骨髄腫細胞で誘導された脾臓リンパ球またはリンパ結節リンパ球の溶融によって生じたものである。模範となる異形骨髄腫細胞ラインは、例えば、HAB-1（ボルマー（Volkmers）外、「癌」74：1525-1532頁，1994），CB-F7（デルビグ（Delvig）外，Hum．抗体ハイブリドーマ6：42-46，1995），K6H6B5（デルビグ外，Hum．抗体ハイブリドーマ6：42-46，1995），H7NS，934（デルビグ外，Hum．抗体ハイブリドーマ6：42-46，1995），SHM-D33（ブロン（Bron）外，Proc．Nat．Acad．Sci．USA 81：3214-3217，1984），およびB6B11（ポリソバ（Borisova）外，Vopr．Virusol，44：172-174，1999）。癌の患者のリンパ管から採取してヒトのモノクローナル抗体を生成することは、その癌患者の腫瘍に対する免疫反応によって発生される抗体の分離として認められる。

【0080】

一般的に、リンパ節或は脾臓の部分は、結腸癌腫や膵臓の癌腫などの癌を有する患者から手術によって除かれる。リンパ球は機械的な手段によって細胞懸濁液として調製され、次で、例えば細胞の融解を招く条件のもとで異形骨髄腫細胞線を以て、例えば1：2または1：3の割合で溶解される。例えば、異形骨髄腫細胞線HAB-1は以上の目的のために使用される。なお、前記細胞線はマウス骨髄腫NS-0でヒトリンパ球の融解により生成される。

【0081】

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

いての能力について試験することも出来る。

【0082】

また、その代りに、抗体を含むポリペプチド或はその断片を、E. 大腸菌またはイースト、例えば、S. セレビシア (*Saccharomyces cerevisiae*) などの増殖細胞におけるポリペプチド或は抗体を圧出することによって造ることが出来る。例えば、この発明の抗体は次に述べるように認めることが出来る。抗体もしくはその断片は、凡そ 10^7 或はそれ以上の抗体のライブラリ (*library*) を発生する線維状のバクテリオファージに挿入される。各ファージはそれに包含されている核酸によって符号化されるその表面に抗体を発現する。このようにして、この発明の抗体はこの明細書中に記載されている機能および組織化学的効力検定によって調査され、検出され、その遺伝子は、その後において、選択され、E. coli と表現される。このシステムは、例えば米国特許第 5, 876, 691 号に示されている。

10

【0083】

抗体または抗体の破片もまた、例えば、組換え方法を利用して直接に合成して発生させることが出来る。これらの方法は技術上、基本的な手段である。例えば、核酸配列をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を利用して増産することが出来る。PCR に関する技術は技術上公知であって、米国特許第 4, 683, 195 号に開示されている。標準的な前記の方法を用いれば、ハイブリドーマによって発現されたモノクローナル抗体の配列が得られ、抗体の機能的な断片を増幅することが出来る。例えば、全部の RNA が腫瘍特定単クローン性の抗体を発現するハイブリドーマから分離することが出来る。次で cDNA が反転トランスクリプターゼを使用する RNA から発生され、重鎖と軽鎖との可変領域の機能的な断片を含有する cDNAs を PCR を用いて増幅する。PCR 生成物は次で清浄化され、表現ベクター、例えばプラスミドまたはウイルス性のベクターにクローン化される。多くの標準ベクターを利用することが出来、適切なベクターの選択は、例えば、ベクターに組入れた DNA のサイズとベクターで変えられる増殖細胞のサイズとによる。

20

【0084】

ポリペプチドのアミノ酸変異体の分離抗体、例えば SAM-6 抗体などのポリペプチドのアミノ酸配列の変形体は抗体を符号化するのに適切なヌクレオチド変化により、或は所望のポリペプチドの生体外での合成によって製造することが出来る。この種の変異体には、例えば、SAM-6 抗体のアミノ酸配列内における残留物の欠失または挿入物或は置換物を含む。最終構成物が所望の特徴、例えば腫瘍性の細胞のアポトーシス (枯死) を招く作用で、非腫瘍性細胞でなかったり、または腫瘍性細胞の増殖を抑える能力のもので、非腫瘍性の細胞でないとするれば、削除、挿入、そして変換を最終構造に達するようにすることが出来る。また、アミノ酸の変化とは抗体の移転後の過程、例えばグリコシル化部位の数または位置を変えること、膜の固着特性の変更、またはタンパク質分解の分裂に対するその感受性の変更などである。

30

【0085】

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

40

【0086】

ポリペプチドの突然変異生成についての特別の残基または部位を同定するための有用な方法を「アラニン走査突然変異生成」と言って、例えばカンニングハム (Cunningham) 氏とウエルズ (Wells) 氏著 (サイエンス 244: 1081-1085 頁, 1989) に記載されている。ここで、ターゲット残基の残留物或はグループ (例えば、arg, asp, his, lys 及び glu などの帯電した残留物) が確認され、そして細胞内部或は細胞外部の周囲の水溶性の環境によってアミノ酸の相互作用に影響して中性もしくは陰電気を帯電したアミノ酸 (最も望ましくはアラニンまたはポリアラニン) に取って代った。次で、置換に対して機能的な感度を示すドメインが置換の場所において、或

50

は置換の部位に関して導入されて精製された。このようにして、アミノ酸配列の変化を導く位置が前以て決定され、突然変位の現象は予定されなかった。例えば、特定の場所における突然変位を利用するために、アラニンスキャニングまたは出任せの突然変異生成がターゲットコードン或は置換領域において行なわれ、圧縮された変種が、例えば、腫瘍性の細胞を枯死させる能力があり、非腫瘍性の細胞は、これを無視し、腫瘍性細胞の増殖を阻止して、非腫瘍性細胞の増殖には何等の影響を及ぼさない性能を現わす。

【0087】

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

【0088】

検出することが出来る物質で抗体の接合

必要に応じて、抗体（例えば、SAM-6などのモノクローナル抗体）、またはその断片を検出することが出来る物質に連結して、哺乳動物の適当な検知可能な病原体の選択物をポリペプチドの意図的な使用に依存し、当業者にとっては明瞭に判るに相違ない。この発明により検出可能な薬剤は、例えば、蛋白質精製標識、細胞毒素、酵素、常磁性のラベル、酵素培養基、補足因子、酵素反応抑制剤、染料、放射性核種、およびビオチンである。

【0089】

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

3 : 3 3 6 - 3 4 0 ページ, 1 9 8 6 年発行; ウォルフ, フィシオル (W o l f , P h y s i o l) 著, P h y s . M e d . N M R 1 6 : 9 3 - 9 5 頁, 1 9 8 4 年刊; ウェスベイ (W e s b e y) 氏外著, P h y s i o l , C h e m . P h y s . M e d . N M R 1 6 : 1 4 5 - 1 5 5 頁, 1 9 8 4 年刊、およびラング (R u n g e) 氏外著, I n v e s t . R a d i o l . 1 9 : 4 0 8 - 4 1 5 頁, 1 9 8 4 年刊)。代るべきものとして、放射性同位元素を使って識別した抗体も、結合している標識付き抗体を組織の外科的な除去を要する放射免疫誘導手術に用いることも出来る。このようにして、識別した抗体を非腫瘍性の組織と区別することによって、腫瘍性細胞の方へと手術を進める。腫瘍イメージングは望ましい一時的な放射性同位元素である。半減期が1時間乃至11.4日間の種々の放射性のある金属が、スカンジウム - 47 (3.4日間), ガリウム - 67 (2.8日間), ガリウム - 68 (68分間), テクネチウム - 99m (6時間), インジウム - 111 (3.2日間) およびラジウム - 223 (11.4日間) などの抗体類に共役するために利用することが出来る。そのガリウム - 67, テクネチウム - 99m およびインジウム - 111 はガンマカメラ映像化のために好ましく、ガリウム - 68 は陽電子放出断層撮影のために望ましく、ガリウム - 68 は陽電子放出断層撮影のために好ましく、スカンジウム - 47 とラジウム - 223 (およびその他のアルファ放出放射性核種) は腫瘍の治療について好ましいものである。

10

【0090】

適切な蛍光マーカーの例を挙げると、フルオレスセイン, イソチオシレート, ローダミン, フィコエリトリン, フィコシアニン, アロフィコシアニン, オブサルデヒド及びフルオレスカミンがある。化学ルミセンスマーカーにはルミナルラベル, イソルミナルラベル, 芳香性アクリジニウムエステルラベル, イミダゾールラベル, アクリジニウム塩ラベル, 蓚酸エステルラベル, イソルミナルラベル, 芳香族アクリジニウムエステルラベル, イミダゾールラベル, アクリジニウム塩ラベル, シュウ酸エステルラベル, ルシフェリンラベル, ルシフェラーゼラベルおよびエクオリンラベルがある。当業者は、その他の適切なラベルを承知しており、この発明に応じて使用することが可能である。単クローン性の、或はその断片などの、この発明によるポリペプチドについて検知することが出来る結合は単クローン性の抗体、またはその断片を当業者が周知の規準となる技術を利用して達成することが出来る。基準となる抗体共役技術はケネディ (K e n n e d y) 氏外著 (クリン・チム・アクタ (C l i n C h i m A c t a) 7 0 , 1 - 3 1 頁, 1 9 7 6 年) およびシューアス (S c h u r s) 氏外著 (クリン・チム・アクタ (C l i n C h i m A c t a) 8 1 , 1 - 4 0 頁 1 9 7 7 年) に記載されており、例えば、グルタルアルデヒド法, 過ヨウ素酸塩法, ジマレイミド法, m - マレイミドベンジル - N - ヒドロキシ - コハク酸イミドエステル法がある。抗体は当業者が周知の数多の技術の何等か、例えば米国特許第4,444,744号を利用して識別することが出来る。これらの方法の総ては、この明細書に掲載した文献に示されている。

20

30

【0091】

この発明においては、異なる標識または同一標識のポリペプチドの特性が同一または異なる腫瘍細胞または腫瘍細胞類形と結合されている異なる抗原または異なるエピトープを使用することが出来る。このような組み合わせは、特定の場合において、検出, 局所限定および/または治療効果を高めることができ、また一種の腫瘍或は腫瘍の類型より以上に広範囲な検査範囲に広げることが出来る。

40

【0092】

抗癌剤に接合されたポリペプチド

この発明のポリペプチドは腫瘍性の細胞のアポトシース, 非腫瘍性細胞の抑制細胞の増殖、或は前記の両者を含むけれども、ポリペプチドは腫瘍性の細胞を殺す薬剤またはその増殖を阻止する物質に接合する。抗体または抗体の断片などのポリペプチドのターゲティングは腫瘍の破壊を高めるために腫瘍に対して細胞に有毒な、或は抗増殖性物質の導出を招く。それゆえ、ポリペプチドは哺乳類、特にヒトの患者の癌の処理や予防に用いることが出来る。ポリペプチドに関連する細胞毒性物質はポリペプチドが結合している腫瘍

50

細胞または腫瘍を破壊または損傷する。この種の物質の例としては、プロ・ドラッグ、即ちサイトカインを活性化する化学療法薬剤或はラジオアイソトープ、酵素類がある。

【0093】

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

10

【0094】

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

【0095】

細胞毒性物質もプロドラッグに有効な酵素とすることが出来る。これは不活性のプロドラッグを腫瘍部位において細胞毒性型に変え、「抗体指定酵素プロドラッグ療法」と呼ばれる。このようにして、ポリペプチド酵素配合体は受療者に対して投薬することができ、治療をすべき腫瘍の領域に局在化されることが出来る。次で、プロドラッグは患者に投薬することのできる制癌剤となり、「抗体指定酵素プロドラッグ療法」と呼ばれる。それからプロドラッグは患者に投薬されて、細胞毒性薬剤となって腫瘍の部位に定位して、局在性の酵素の影響を受けて治療するようになる。模範的な酵素は細菌性のカルボキシペプチダーゼG2（CPG2）であって、その用途は、例えばWO88/07378号に記載されている。ポリペプチド酵素配合体は、希望であればWO89/00427号の述べるところに従って、腫瘍の近辺でない体の部分の酵素を不活性化する。

20

【0096】

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

30

【0097】

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

【0098】

用量

この発明の治療法について、患者に対するこの発明のポリペプチドの投与はその投与に対する特定の様式、用量または投与間隔の頻度について考慮するものではない。即ち、この発明は筋肉内、静脈内、腹腔内、脈管内、関節内、病巣内、皮下或は腫瘍細胞の増殖を抑制することにより腫瘍性の細胞の枯死によって腫瘍性細胞の数を減少させるのに適当とする投与量であれば、どのような経路をとっても問題とすることはない。これらの複合体は患者に対して1回量または多数の用量を投与する。多数の用量を投与する場合には、その投与を、例えば、1日、2日、1週間、2週間或は1ヵ月などのいずれかに分ける。例えば、ポリペプチド（例えばSAM-6のような単クローン性の抗体）を1週間に1回、例えば、2、3、4、5、6、7、8、10、15、20週間またはそれ以上の週に1回投与する。どのような特別の場合でも、一定の投与秩序を乱すことなく、特定の投与規定を、その個人に対して調節し、人への投与あるいは管理を専門医として判断する必要がある。精確な投与量は使用されるポリペプチドによって異なり、ポリペプチドが結合するリ

40

50

ガンドとポリペプチドの浄化値によって異なる。例えば、低量の投与では十分に、対腫瘍性効果を挙げない場合には、SAM-6抗体の投与量を増加することが出来る。これとは反対に患者から腫瘍が消滅した場合には、SAM-6抗体の用量を減らすことが出来る。

【0099】

担当している医師が最終的に適切とする量および用量を投与している間は、モノクローナル抗体またはその断片は、例えば、体重1kg当り1日約0.1mg乃至50mg或は体重1kg当り毎週0.7mg乃至350mgの範囲内とする。治療に有効な量は例えば約0.50mg/kg乃至20.0mg/kg、更に望ましくは、約0.50mg/kg乃至15.0mg/kgで、例えば約0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0, 8.5, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0, 13.0, 14.0または15.0mg/kg体重を毎日、または隔日、或は1週に1回とする。例えば、適当な投与量は、前述したように投薬された場合、ポリペプチドの量は細胞の枯死を招き、少なくとも20%以上が基礎量（未処理）レベルである。一般に、適当な用量と処置と治療法とが治療および/または予防に良い影響を及ぼす。このような反応は、治療した患者を治療をしなかった患者と較べて、治療した患者は臨床の成果（例えば、病状の軽減、完成または部分的或は長期無症候生存）を達成することが認められたのである。この発明によるならば、ポリペプチドの投与は、当業者にとって周知となっている凡ゆる通常の効力検定によって、未処理の者に対して、少なくとも20%, 40%, 50%または75%以上、腫瘍性の細胞を枯死に導いている。更に好ましいことには、増殖が未処理に較べて80%, 90%, 95%、または100%まで阻止されている。

それとはまた別個に、ポリペプチドを投与すると、腫瘍性の細胞の増殖を当業者が周知の標準的な効力検定によって測定した場合に、未処理の場合よりも少なくとも20%, 40%, 50%, または75%まで抑制することができる。

それ以上に望ましいことには、増殖が当業者が周知している凡ゆる標準の効力検定で未処理のそれよりも80%, 90%, 95%, あるいは100%も下位に増殖をおさえることができる。最高に望ましいことは、ポリペプチドが、増殖を阻止し、未処理の対照細胞に関して腫瘍性の細胞を枯死に導くことである。

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

【0100】

薬剤の組成の形成

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

【0101】

医薬の組成は処方箋に基づく投薬の形式で、或は通常の毒性の無い医薬として認められる基材および補助剤を含有する適切な投薬装置または挿入管を介して、注射、注入、また

体内移植（皮下，静脈，筋肉内，腹腔内など）に送り込むことが出来る。もしも腫瘍性の細胞が（例えば白血病で）血液と直接に接触していたり、或は腫瘍には専ら静脈（I.V.）のルートで接近することが出来る。腫瘍が、例えば胞腹腔或は腹膜の空洞などの限られた場所に生じた場合には、血流を経て送るよりも、直接に空洞中に送り込むことが出来る。このような調合剤の組成および製法は医薬の調剤の技術に於ては周知である。その調剤法はレミントン（Remington）のザサイエンスアンドプラクティスオブファーマシースupra（The Science and Practice of Pharmacy supra.）に記載されている。

【0102】

癌の進行の診断と監視

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

【0103】

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

【0104】

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

【0105】

生体内での腫瘍の検出

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

【0106】

ポリペプチドは、好ましくは、検出を容易にするか、ポリペプチドの反応の測定を容易にする検知可能な物質に結合させることである。生物学上のサンプルは腫瘍性の細胞を含んでいる、例えば、血液，唾液，血清，粘液，痰，尿或は涙などが挙げられる。生物学的

10

20

30

40

50

試料もまた組織の部分で、固定された組織，新鮮な組織または凍結組織とする。腫瘍は生物学的試料について抗体の反応性のレベルが増加して、対照試料以上に生物学的試料についての抗体の反応性のレベルが上昇する場合に得られた試料である。その増加率は、対照レベルよりも上で、少なくとも10%，20%，30%，40%，50%以上である。結合または反応性のレベルは当業者が周知の方法で決定することが出来、更にその詳細については後述する。

【0107】

生体外での診断の効力検定

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

【0108】

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

【0109】

この発明のポリペプチドは腫瘍細胞の自然位検出または定量測定について組織学的に用いることが、例えば、免疫蛍光法または免疫電子顕微鏡検査法によって出来る。こうした手段を利用することは、検体の腫瘍細胞の検出に役立つだけでなく、その空間分布の測定にも役立つのである。別の例としては、生物学的試料はスライド上の腫瘍細胞を含んでい

る生物学的物質の塗抹標本とすることができ、生物学的物質中の腫瘍細胞の検出を顕微鏡の塗抹標本を調べるか、或は血球計算によって標本を調べることによって行うことが出来る。

【0110】

腫瘍の生体検出

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

10

【0111】

治療

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

20

【0112】

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

30

【0113】

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

40

【0114】

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

【0115】

ポリペプチドと他の抗腫瘍治療法との組み合わせについて

50

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

【0116】

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

【0117】

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

【0118】

例1 原料と方法

細胞培養

この研究に当っては、次のヒトの細胞株を用いた。B X P C - 3（脾臓の腺癌）、23132 / 87（胃の腺癌）、C O L O - 206F（コロンの癌腫）、C O L O - 699（肺の腺癌）およびL O U - N H 9 1（肺の鱗状細胞癌腫細胞）、R P M I - 2650（鼻の隔壁鱗状細胞癌腫細胞）およびH N E p C - c（正常の鼻の上皮の細胞）。細胞株はR P M I - 1640培養地（P A A、ウィーン、オーストリア）で10%ウシ胎児血清（F C S）で補充された10%胎児の脛の漿液（F C S）、2 mMグルタミン及びペニシリン / ストレプトマイシン（共に1%）と加湿した37 °Cの5%CO₂雰囲気において培養された。効力検定に関して述べるために、細胞を集合するように生長させ、トリプシン / E D T Aで分離し、これを使用する前にリン酸塩緩衝食塩水（P B S）で2度洗

浄した。

【0119】

ハイブリドーマの製作

次に述べるようにしてH A B - 1 異種骨髄腫に永続性のリンパ球を融合した。そしてH A B - 1 異種骨髄腫を添加物なく毎分1500回転の速度で5分間遠心分離した。次で、脾臓あるいはリンパ節の一方から得た溶けたリンパ球或はリンパ結節から解凍したリンパ管を得た。それから、これらの細胞に何等の添加物を加えることなく、これをR P M I 1640を用いて2回洗ってから、5分間、毎分1500回転して遠心分離して、ノイバウエル細胞計算室で計算した。また再び細胞を洗浄し、H A B - 1 細胞とリンパ球とを1 : 2乃至1 : 3の割合に混合して、毎分1500回転させて8分間、その混合物を遠心分離した。前以てポリエチレングリコール1500 (P E G) を37 に暖めて、注意深くP E Gをペレットに滴下し、50mlの管をゆっくりと回転して、ペレット上にP E Gを流した。次で、ペレットをゆっくりと再び懸濁して、37 の水浴で正確に90秒間、その管を回転した。次で、添加物なしのR P M Iの10mlで細胞を2回洗い、毎分1500回転で5分間、遠心分離した。R P M I 1640の1mlをH A Tサプリメント (P A A , ウィーン , オーストリア) と10% F C S , 1% グルタミン、および1% ペニシリン / ストレプトマイシン (“ R P M I 1640 H A T ”) を24 - w e l l 板の各w e l l に加えた。それから、24 - w e l l 板を37 定温器に配置して、R P M I 1640 H A T培養基を毎週取り替えた。4週間乃至6週間後に、細胞培養物の上澄の物質を酵素連鎖性の免疫吸着物効力検定 (E L I S A) における抗体を生産するために分離した。

【0120】

このプロトコルを用いて、発生されたトリオマス (t r i o m a s) の凡そ80%乃至90%は、生長することが出来るものであって、その凡そ50%は分泌免疫グロブリンである。陽性のクローンは自家移植の腫瘍組織部分に関して免疫組織化学的に試験され、それによって後に再びクローンにされる。

【0121】

c D N A 合成とR T - P C R

抗体の配列順序を得るために、キアゲン (Q i a g e n) からR N A S Eキット (K i t) を用いてトリオマ (t r i o m a) から総てのR N Aを分離した。全体のR N Aは技術上基準とされている方法を利用して作成した。なお、技術上の基準としては、クレーン氏 (K r e e n) 氏外著 (クリン . E x p . 免疫学) (C l i n . E x p . I m m u n o l . 115 : 168 - 175頁 , 1999) 、に記載されている。ハイブリドーマ細胞株S A M - 6 から得た全体のR N Aからのc D N A合成は製造家の指示によるギブコ (G i b c o) B R L (エゲンステイン , ドイツ) (E g g e n s t i n , G e r m a n y) M - M L V レーバース トランスクリプターゼ (R e v e r s e T r a n s c r i p t a s e) を用いる5 μ g トータルR N Aで行なわれたハイブリドーマ細胞株から得た完全なR N Aからc D N Aを合成する。V_H とV_L 遺伝子の増幅修飾物質は1 . 75mM M g C l₂ で、25 μ l 容量で、0 . 4pMプライマー、各d N T Dの200 μ M、および1 U T a q ポリメラーゼ (M B I フェルメンタス , S t . レオン - ロト , ドイツ) (M B I F e r m e n t a s , S t . L e o n - R o t , G e r m a n y) で行われた。P C R - 生成物は次のサイクルプロフィールを使用して増産された。即ち、(V H 3 と V H 4 プライマーについて) 2分間 ; 95 、次で30秒間94 で35サイクル ; 30秒間65 , V L プライマーについて、それぞれV H 1 , V H 2 , V H 5 , V H 6 について60 、そしてV L プライマーに関して52 ; 72 で4分間の最終延長。

【0122】

抗体の配列決定法

P C Rをジェットソープ (J e t s o r b) ゲル抽出装置 (ゲノームト , バド , オインハウゼン , ドイツ) (G e n o m e d , B a d O e y n h a u s e n , G e r m a n y) を使用してP C R生成物のゲル抽出に従った2%アガロースでゲル電気泳動法 (ロス ,

カルスルー，ドイツ）（R o t h , K a r l s r u h e , G e r m a n y ）で精製した。次で、PCR生成物はp C R - S c r i p t A m p S K + クローン化装置（スッラターゲン，ハイデルベルグ，ドイツ）（S t r a t a g e n e , H e i d e l b e r g , G e r m a n y ）を使用してクローン化した。10個の陽性のクローンをダイデオキシ（D y e D e o x y ）ターミネーションサイクル配列装置（アプライト バイオシステムズ インク．，ウェイトルスタッド，ドイツ）（A p p l i e d B i o S y s t e m s I n c . , W e i t e r s t a d t , G e r m a n y ）を用いて配列され、ABI Prism 373 自動化DNA配列装置）で分析された（前記の両要素はT3とT7プライマーを使用して配列された）。それらの配列はウインドウズ（W i n d o w s ）配列比較ソフトウェアのDNASISとゲンバンク（G e n B a n k ）及びIMG T/V - Q U E S Tデータベースを使用して分析された。インターナショナル免疫遺伝学（“ I M G T ”）データベースは、ユニバーシティ モントペエリア，モンペエリア，フランス（U n i v e r s i t e M o n t p e l l i e r , M o n t p e l l i e r , F r a n c e ）のマリー・ポール・レフランク（M a r i e - P a u l e L e f r a n c ）によって配位されている。

10

【0123】

パラフィン部分の免疫組織化学の染色

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

20

【0124】

パラフィンの除去：

- ・キシレン1 5 滴
- ・キシレン2 5 滴
- ・100%エタノール1 5 滴
- ・100%エタノール2 5 滴
- ・メタノール（70 ml ） + H₂O₂（500 μ l ） 5 滴
- ・90%エタノール1 3 滴
- ・90%エタノール2 3 滴
- ・80%エタノール1 3 滴
- ・80%エタノール2 3 滴
- ・70%エタノール1 3 滴
- ・70%エタノール2 3 滴
- ・T r i s / N a C l で1回洗う
- ・加熱：300 ml d e s t . 圧力加熱器にクエン酸を入れて5分間加熱
- ・B S A / P B S , 顕微鏡のスライド1枚当り150 μ l で15分遮断
- ・T r i s / N a C l で1回洗浄
- ・第一の抗体：顕微鏡のスライド1枚当り150 μ l , 加湿された容器において37

30

の温度で2 . 5 時間培養

- ・T r i s / N a C l で3回洗浄
- ・第二の抗体：顕微鏡のスライド1枚当り150 μ l , 室温で加湿した容器内にて45
- 分間培養（700 μ l P B S + 300 μ l A B - 2 プラズマ + 20 μ l 抗体）
- ・T r i s / N a C l で3回洗浄
- ・P B S に10分間置く
- ・ジアミノベンチジン（0 . 05 % ） - 過酸化水素（0 . 02 % ）で10分間培養：顕
- 微鏡スライド当たり150 μ l
- ・H₂Oで3回洗浄，次で蒸留したH₂Oで1回洗浄
- ・血毒素中に5分間入れておく
- ・水道水を10乃至15分流す中に置く
- ・蒸留したH₂Oで洗浄
- ・グリセロールゼラチンで被覆

40

50

【0125】

腫瘍細胞膜抽出物の調製

腫瘍細胞よりの細胞膜の分離は、例えばエンセル氏 (Hensel) 外の (Int. J. Cancer 81: 229-235, 1999) に記載されているように、技術上の標準的な方法を利用して、その記載の通りに行なわれた。特に、融合した腫瘍細胞 (BXP C-3 と 23132/87) は PBS で二度洗浄し、細胞剥離器で組織回収し、低張緩衝液 (20 mM HEPES, 3 mM Cl, 3 mM MgCl₂) 中に再度懸濁し、冷蔵庫に入れて 15 分培養した。次で細胞を 5 分間音波によって破碎し、核を 10 分間 10,000 × g にて遠心分離して小球 (ペレット) にした。上澄み液は膜を小球にするためにスウィング-アウト (swing-out) ローターで、100,000 × g について 40 分間遠心分離した。できた小球を低張緩衝液で洗浄した後に、その小球を膜溶解緩衝液 (50 mM HEPES pH 7.4, 0.1 mM EDTA, 10% グリセロール及び 1% 三重陽子 X-100) に再び懸濁した。完全なタンパク質分解酵素抑制因子 (ボエヒリンジャー, マンハイム, ドイツ) (Boehringer, Mannheim, Germany) もまた総ての溶液に加えられた。

10

【0126】

ウエスタンブロッティング

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

20

【0127】

超微構造研究

癒着性進行性胃癌細胞株 23132/87 を指示された期間 10 µg/ml SAM-6 抗体または関連のないヒト対照 IgM で指示された時間をかけて培養した。次で載せたガラスをソエレエンセン (Soerensen) 緩衝液 pH 7.4 (ラスター電子顕微鏡のため) で 2.5% グルタルアルデヒド (電子顕微鏡) 或は 6.25% グルタルアルデヒドで固定し、顕微鏡検査分析のために調製した。細胞の形態学を電子顕微鏡と透過型電子顕微鏡とを走査して調べた。

30

【0128】

ズダン I I I 染色

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

40

【0129】

ナイルレッド染色

フェノキサジン染料で染色する中性のリピドを (グリーンズパン, P., メイヤー, E. P., とフォウラー, D. ナイルレッド: アセレクトィブ フローレスセント フォア イントラセルラー リピド ドロップレット, J. セルビオル, 100, 965-97

50

3, 1985) (Greenspan, P., Mayer, E. P., and Fowler, D. Nile Red: A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets. J. Cell Biol. 100, 965-973, 1985) に以前に述べた通りに行なった。簡単に述べると、胃癌細胞 23132/87 をガラス板上にて生長させ、付着細胞を 48 時間 SAM-6 抗体 (30 g/ml) で培養し、それから 5 分間 1.5% グルタルアルヒドで固定し、HEPES 緩衝液で洗浄し、HEPES 緩衝液 (アセトンについて 1 mg/ml ナイルレッドの保存溶液) の 1:200 希釈液で培養した。HEPES 緩衝液で更に洗浄した後に、細胞核を 8 分間 DAPI (水で 1:1000 に希釈) で染色した。それから細胞を再度洗浄してフルオロマウント-G (Fluoromount-G) (SOUTHERN バイオテクノロジー ASS., Inc., 米国) (SOUTHERN Biotechnology Ass., Inc., USA) に乗せた。蛍光分析を Leica TCS SP2 同焦点レーザー顕微鏡で行った。極性脂質は暗赤色 (543 nm) に染色され、中性の脂質は黄色 (488 nm) に染色され、細胞核は青色 (350 nm) に染色された。

10

20

30

40

50

【0130】

oxLDL の検出

LDL (シグマ, タウフキルヘン, ドイツ) (Sigma, Taufkirchen, Germany) が 20 μ M CuSO_4 で 15 時間づつ 3 回かけて培養して酸化させた。酸化された LDL の量をメルコディア酸化 LDL ELISA (メルコディア, ウプサラ, スウェーデン) (Merckodia, Uppsala, Sweden) で決定した。

【0131】

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

【0132】

SAM-6-oxLDL 相互作用計量

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

【0133】

細胞内で強化された脂質のクロマトグラフィー分析

BXPC-3 細胞類を、それぞれヒトに無関係の対照免疫グロブリン (クロムピューア IgM, ダイアノバ, ドイツ) (Chrompure IgM, Dianova, Germany) を 24 時間 30 μ g SAM-6 抗体を培養した。次で、細胞類をトリプシン/EDTA を用いて剥離し、次で PBS で Step ps を 2 度洗浄した。細胞ペレット

を使用するまで20℃で貯蔵した。リピドを細胞ペレットから取り出した。その取り出されたリピドは250μlクロロホルム/メタノール(2:1)に溶解され、10回別々に25μlが(SiO₂, シリカゲルで被覆された)薄層クロマトグラフィー平板の起始点において拡散培養された。外部右側と左側とにおいて、異なる周知のリピド(コレステロールエステル, コレステロール, トリグリセリド, オレイン酸, ホスバチジレサノルアミン, ホスファチジルコリン, スフィンゴミエリン)が詰められた。極性を持たないために脂質ヘキサン/酢酸エチル/酢酸(90/10/1)がリン脂質等、クロロホルム/メタノール/H₂O(70/30/5)の

ための有機溶剤として使用される。染色は、「ケーギミーシェル」(Kägi-Miescher)エ

10

アゾール試薬(酢酸で溶解されたアニスアルデヒド/硫酸)を用い色付けが最適の状態になるまで150℃での加熱を続けた。

【0134】

生体におけるSAM-6活動度の検出

生体における腫瘍細胞の生長に関する抗体SAM-6の効果を確定するために、scid-マウス/ヒト脾臓腫瘍細胞システムを用いた。C, B-17/IcrHanHsd-scid mice(ハーラン ウィンケルマン ゲーエムベーハー, ボルチェン, ドイツ)(Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Germany)(材齢6-8週, n=10 per group)を皮下にat day 0で2×10⁶ヒト脾臓腺癌細胞株(BXPC-3)を接種し、1, 3, 5, 7および9日毎にSAM-6抗体にi.p.ポスト癌腫細胞をSAM-6抗体(200μg)の注射で行った。複数の実験対照用マウスに同じ濃度で関連の無いヒトIgM(クロンピューアIgM, ディアノバ, ハンブルグ, ドイツ)(Chrompure IgM, Dianova, Hamburg, Germany)を同じ濃度で注射した。可視腫瘍生長を実験中肉眼で測定した。それらの実験は腫瘍が最大の許容サイズ(day 25)に到達した時に終了したので、実験対称マウスは犠牲になり、腫瘍容量と腫瘍重量とが測定された。

20

【0135】

例2 SAM-6単クローン性抗体を表現する細胞株の発生

前述した通り、ヘテロ骨髄腫細胞株HAB-1(ファラー氏外著, Br. J. 癌62: 595-598頁, 1990)(Fallier, et al., Br. J. Cancer 62: 595-598, 1990)で癌患者の脾臓或はリンパ節から得たリンパ球を溶解してハイブリドーマを発現するSAM-6モノクローナル抗体を得た。リンパ様の線源は患者の年齢や性別について前以てそれを選択しなかった。終結の細胞は3つの細胞の融合のように、トリオマ(trioma)として知られているハイブリドーマの型式のものである。正常のB-リンパ球のように、このトリオマ(trioma)は抗体を造り出す能力がある。トリオマの特殊性は3種類の細胞の融合のようなものである。正常のB-リンパ球のように、このトリオマは抗体を作り出す能力を備えている。抗体の特殊性はトリオマを発生するために利用された患者からの最初のリンパ球の特異性によってきまるのである。

30

【0136】

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

40

【0137】

ヒトのモノクローナル抗体SAM-6の軽鎖の可変領域のアミノ酸配列(SEQ ID NO: 1)と核酸配列(SEQ ID NO: 2)を図8aと8bとに示してある。ヒトのモノクローナル抗体SAM-6の重鎖の可変領域のアミノ酸配列(SEQ ID NO: 3)と核酸配列(SEQ ID NO: 4)は図9aと9bとに示してある。図8bと9bとにおいては、異なる相補性決定領域(CDRs)が示してある。ポリペプチド配列の相補性決定領域(CDRs)はアミノ酸配列から成っていて、その配列は次に示すア

50

ミノ酸配列と実質的に同一である。その配列は、Ser - Gly - Asp - Lys - Leu - Gly - Asp - Lys - Tyr - Ala - Cys (CDR1), Gln - Asp - Ser - Lys - Arg - Pro - Ser (CDR2) と軽鎖 (V_L) の可変領域の Gln - Ala - Trp - Asp Ser - Ser - Ile - Val - Val (CDR3) である。一方、ポリペプチドアミノ酸配列の補足性決定領域 (CDRs) は次に示すアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列から成っている。前記アミノ酸配列は Ser - Tyr - Ala - Met - His (CDR1), Val - Ile - Ser - Tyr - Asp - Gly - Ser - Asn - Lys - Tyr - Tyr - Ala - Asp - Ser - Val - Lys - Gly (CDR2) 及び L 鎖 (V_H) の可変領域の SEQ ID NO: 3 の Asp - Arg - Leu - Ala - Val - Ala - Gly - Lys - Thr - Phe - Asp - Tyr (CDR3) である。ポリペプチドアミノ酸配列の相補性の決定領域 (CDRs) は次に示すアミノ酸配列と全く同一のアミノ酸配列から成っている。なお、前記アミノ酸配列は、次の通りである。軽鎖 (V_H) の可変領域の Ser - Tyr - Ala - Met - His (CDR1), Val - Ile - Ser - Tyr - Asp - Gly - Ser - Asn - Lys - Tyr - Ala - Asp - Ser - Val - Lys - Gly (CDR2) 及び Asp - Arg - Leu - Ala - Val - Ala - Gly - Lys - Thr - Phe - Asp - Tyr (CDR3)。

10

【0138】

例3 抗体の免疫組織化学の特性

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

20

【0139】

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

30

【表1】

【0140】

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

【表2】

【0141】

生殖細胞遺伝子についてのV_H 領域の高度相同性 (100%) と低R/S比率は、抗体の親和性亢進の指示であって、その抗体が抗原近接性に基づいて変化されなかったことを示す。V_L 体節の塩基配列は快適相同性V_L 生殖細胞遺伝子に対して更に高い。そのデータはSAM-6抗体が自然非親和性の成熟した抗体のファミリーに属することを示している。

40

【0142】

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

【表 3】

モノクローナルSAM-6抗体と正常の組織に対する反応パターン

組 織	SAM-6
食 道	—
胃	—
結 腸	—
膵 臓	—
肺	—
胸	—
子 宮	—
甲状腺	—
睪 丸	—

10

【0143】

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

【表 4】

モノクローナルIgM SAM-6抗体の腫瘍細胞に反応するパターン

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

20

30

【0144】

抗体SAM-6の陽性反応は明瞭に陽性反応が胃の腺癌に限定されず、その他、胸の侵入性小葉癌腫にも観察された(図1A)、また結腸の腺癌も観察され(図1B)、そして食道の扁平細胞癌腫も観察された(図1C)。これらの実験に使用した陽性対照抗体はヒト細胞5/6に対抗するマウスモノクローナル抗体であった(“CK5/6;”ダコA/Sデンマーク)またはヒトサイトケラチンに対抗するマウスモノクローナル抗体であった(“CAM5.2;”ベクトン・ディキンソン, ニュージャージー)(CAM5.2; Becton Dickinson, New Jersey)。

40

【0145】

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

【0146】

例4 抗体が枯死を誘導するか否かの決定

抗体が細胞を枯死に導くのであれば多くの効力検定基準を利用することが出来る。

【0147】

50

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

【0148】

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

【0149】

同図のY軸は参考波長415nm及び490nm（A₄₁₅-A₄₉₀）における吸光度の差で、負の制御はRPMI 1640培養液である。SAM-6抗体の濃度は上澄みにおいて、両方とも4μg/mlであった。

【0150】

例5 抗体が細胞の増殖を阻止するか否かの決定

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

【0151】

MTT効力検定のために、細胞（23132/87）の抗トリプシン性を破壊し、10%ウシ胎児血清（FCS）、1%グルタミンおよび1%ペニシリン/ストレプトマイシン（完全培地）を含有するPRMI-1460媒質10mlに前記細胞を再び懸濁した。次で細胞を計数し、 1×10^6 細胞/mlに希釈した。この懸濁物の50μlを96-井戸型平板の容器中でピペット操作し、凡そ 5×10^4 細胞/容器のものとした。容器の最初の列は空所にしておいた。次に、各容器に対して完全な培養液に希釈した抗体の50μlを加えた。次で、96-井戸型平板を37 恒温器内で24時間かけて培養した。潜伏期の後に、50μl MTT溶液（PBS中に5mg/ml）を各容器に加えた。96-井戸型平板を37 で30分間培養し、800gにおいて5分間遠心分離した。その上澄みを吸引し、ジメチル-サルフォ酸化物（DMSO）を各容器に加え、細胞ペレットを再懸濁した。ELISA（酵素標識免疫吸着測定器）にて540nmの波長と690nmの基

準波長とで吸収が決定された。

【 0 1 5 2 】

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

【 表 5 】

【 0 1 5 3 】

例 6 腫瘍の生体イメージング

結腸癌腫のような腫瘍にかかっていると思われる患者には、放射性ヨウ素化 S A M - 6 抗体の投与量を与えることができ、或は他の腫瘍の特効薬ポリペプチドを与えることが出来、この明細書に記載した方法を用いて放射性標識を付けた非特異性抗体を与えることが出来る。画像化するための腫瘍の集積はゴールドンバーグ（G o l d e n b e r g）氏外の方法によって実行することが出来る（N . E n g l , J . M e d . , 2 9 8 : 1 3 8 4 , 1 9 7 8）。静脈注射によって、 ^{131}I - S A M - 6 抗体と T c - 9 9 m 標識付非特異的抗体を患者に投薬することも出来る。試薬 I . V . の投薬に先立って、患者を抗体調合製剤（標識なし）に対する過敏性或は同種類の抗体に対して抗体調合製剤を予備調査する。 ^{131}I の甲状腺摂取率を遮断するために、ルゴール液を、放射性ヨウ素化抗体を注入する 1 日または数日前に、日に 2 回または 3 回 5 滴経口投与する。人体のいろいろな部位の画像および観察を標識を付した調合薬の注射後 4 , 8 及び 2 4 時間に行う。もしも、腫瘍、例えば、結腸直腸の腺癌が、ガンマカメラによって、デランド（D e l a n d）氏外（C a n c e r R e s . 4 0 : 3 0 4 6 , 1 9 8 0）によって、 ^{131}I と標識されたような ^{131}I 標識付き a n t i - C E A 抗体と T c - 9 9 m - 標識付きヒト血清アルブミンから T c - 9 9 m 計数の減殺で画像化するガンマカメラで検出される。注射後 8 時間に、画像化されたイメージングは通常、明瞭で、24 時間まで走査してもイメージングを明瞭で改善される。

10

20

【 0 1 5 4 】

例 7 標識付き抗体混合物を用いる腫瘍の治療

腫瘍である診断をされた患者、例えば胸の癌であると診断を受けた女性の患者をこの発明のポリペプチドを用いて次のように処置した。ルゴール用機器を毎回 3 回例えば 7 滴投与した。次で、 ^{131}I - S A M - 6 抗体の治療投与量を患者に投薬した。例えば、 ^{131}I の 5 0 m C i の投与量を 3 週間、各週に与え、次いで感覚を個人差を考慮し、例えば 3 ヶ月間、血液額の毒性が中断するまで繰り返した。正確な処置の治療方式は、処置を管理する医師によって一般的に決められる。放射性ヨウ素抗体を生理的食塩水 5 0 m l 中に静脈内に投与した。3 度目投与後に、最初の腫瘍の大きさが減少し、転移も注目された。特に第 2 回目の治療サイクル、あるいは 1 0 週間後に注目されたのである。

30

【 0 1 5 5 】

例 8 共役抗体を用いる処理

腫瘍、例えば胸と肺とに転位した乳癌の女性の患者を ^{131}I - S A M - 6 , ^{10}B - S A M - 6 及び T c - 9 9 m の標識付き非特異的抗体の溶液を用いて治療した。（無菌の生理食塩水 5 0 m l 中の） ^{131}I - 標識付き S A M - 6 抗体の量は体重 7 0 k g の患者を対称として投与された ^{131}I 活動度の 1 0 0 m C i を供給するのに充分であった。この投薬量は抗体の分子当り 4 0 - 8 0 ホウ素 - 1 0 原子を具備する抗体の 3 . 3 m g に同等する。

40

腫瘍は前記例 6 の方法を適用して最初に精密に局在化された。更に、ルゴール液を、前記の例に述べたように、患者に継続して投与した。熱中性子の完全に照準のあった線束を特定の腫瘍部位に集束した。8 - 2 0 分間に送られた 4 0 0 - 8 0 0 放射線吸収線量の外部中性子ビームが各腫瘍部位に作用し、個人を基礎として間隔を調節して放射性標識付または標識無しで、腫瘍局在抗体の投与が任意に繰り返えされた。しかし同時に外部放射療法を行うことなしに総量 3 2 0 0 の放射線吸収線量を越えることがなければ、治療することが適用された。所望するならば、この治療に加えて、化学療法薬などの抗腫瘍形成物質を患者に投与することも出来る。

50

【 0 1 5 6 】

その他の実施態様

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

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 5 7 】

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

10

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

【 図 3 A 】 胃癌細胞株 2 3 1 3 2 / 8 7 と膵臓癌腫腺 B X P C - 3 から抽出した膜タンパク質がニトロセルローズに吸い取り、抗体 S A M - 6 で着色したものを示す図。

【 図 3 B 】 抗体 S A M - 6 のアポトーシス活動度を細胞死亡検出 E L I S A ^{P L U S} によって探索したものを示す図。

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

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

20

【 図 5 】 透過型電子顕微鏡 (T E M) 検査の結果を示す。

【 図 6 】 誘導リポド蓄積を検査するために、スダン I I I による染色検査法の結果を示す。

【 図 7 】 細胞のリポドをナイルレッド検査法による実験の結果を示す。

【 図 8 A 】 C u S O ₄ で L D L を培養して o x L D L の量が増加することを示す。

【 図 8 B 】 o x L D L が S A M - 6 抗体の好ましい結合パートナーであることを示す。

【 図 9 a 】 薄層クロマトグラフィーで分析した培養細胞のリポドの組成を示す。

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

30

【 図 1 0 a 】 S A M - 6 抗体または制御抗体で処理された腫瘍接種マウスで生体内で行った実験の結果を示す。

【 図 1 0 b 】 S A M - 6 抗体または制御抗体で処理された腫瘍接種マウスで生体内で行った実験の結果を示す。

【 図 1 】

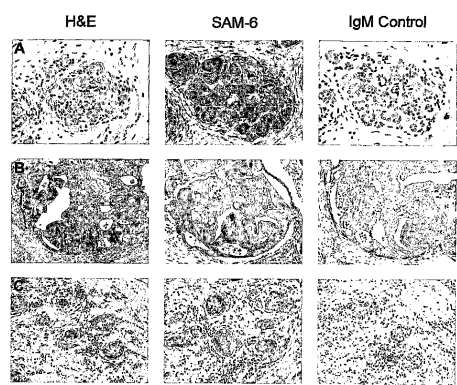


Figure 1

【 図 2 】

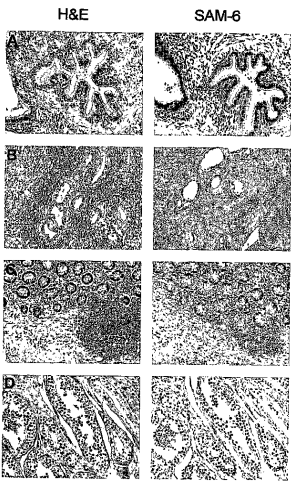


Figure 2

【 図 3 】

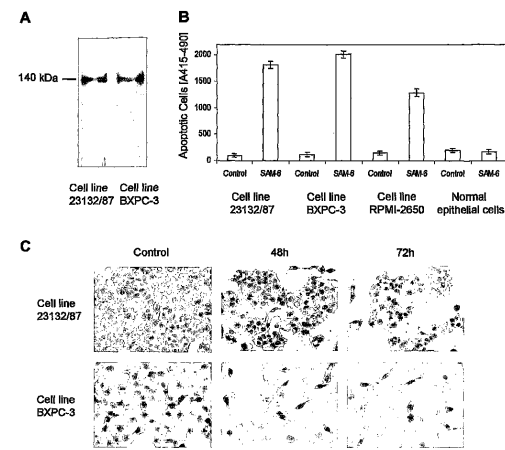


Figure 3

【 図 4 】

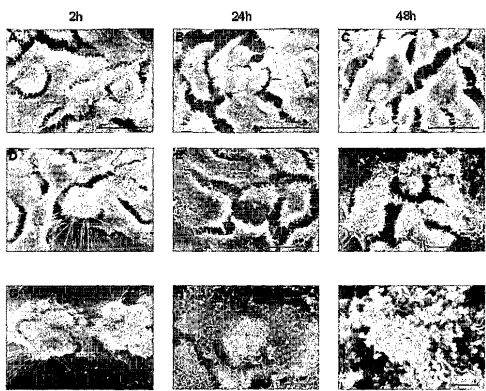


Figure 4

【 図 5 】

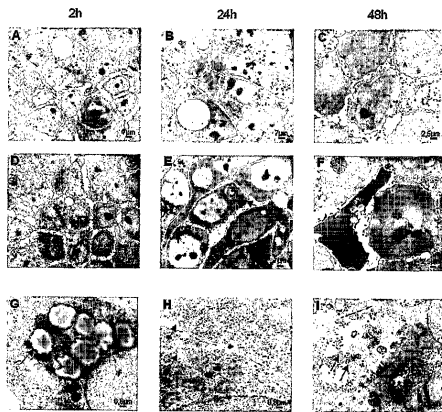


Figure 5

【 図 6 】

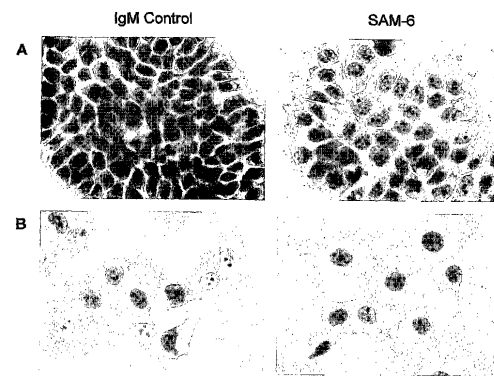


Figure 6

【 図 7 】

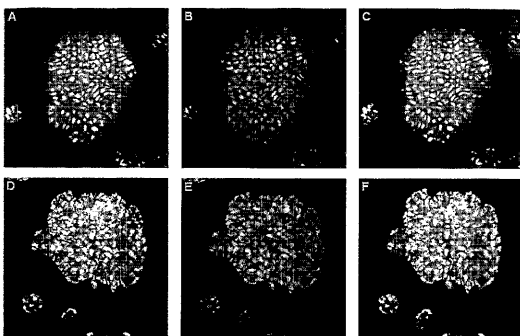


Figure 7

【 図 8 】

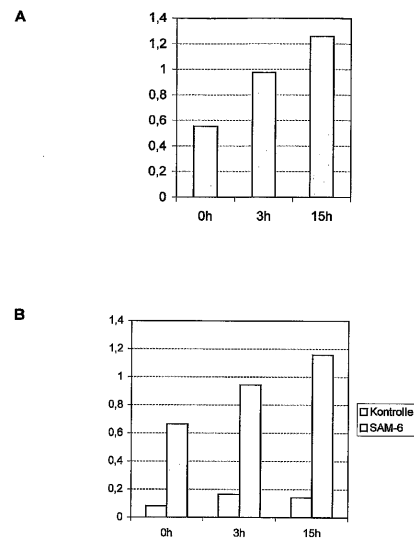


Figure 8

【 図 9 a 】

A

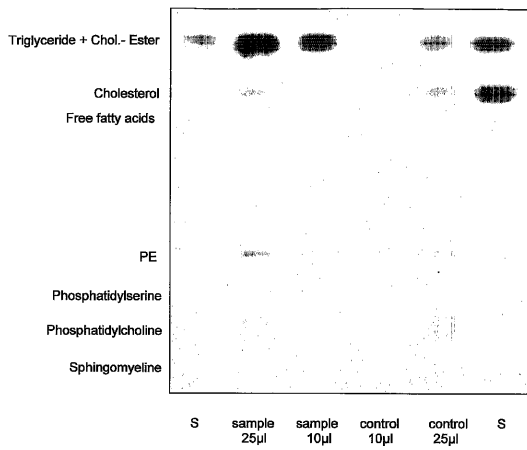


Figure 9a

【 図 9 b 】

B

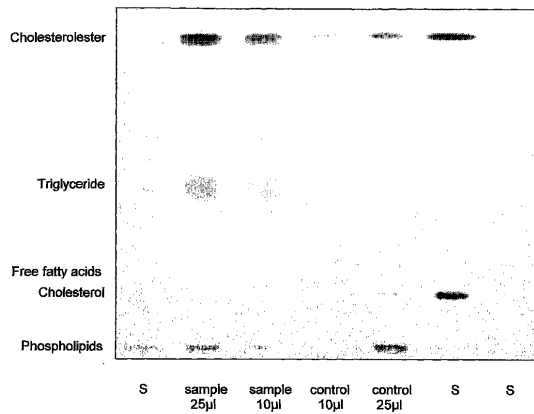
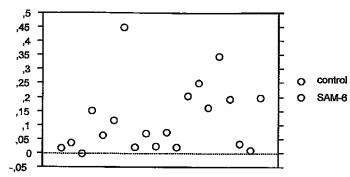


Figure 9b

【 図 1 0 】

A



B

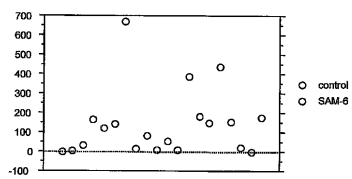


Figure 10

【配列表】

2008507951000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/012970

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C07K16/30 A61K47/48	C12N5/12 A61P35/00
C07K7/06	G01N33/574	G01N33/577
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	WO 03/076472 A (MUELLER-HERMELINK HANS KONRAD ;ONCOMAB GMBH (DE); VOLLMERS HEINZ P) 18 September 2003 (2003-09-18) page 2, line 6 - line 25 page 18, line 21 - line 24	1-71
X	VOLLMERS H PETER ET AL: "Adjuvant therapy for gastric adenocarcinoma with the apoptosis-inducing human monoclonal antibody SC-1: First clinical and histopathological results" ONCOLOGY REPORTS, vol. 5, no. 3, May 1998 (1998-05), pages 549-552, XP009015315 ISSN: 1021-335X the whole document	1-71
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex		
* Special categories of cited documents "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
12 April 2005		02/05/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Le Flao, K

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/012970

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/53051 A (GENSET SA ;DUCLERT AYMERIC (FR); DUMAS MILNE EDWARDS JEAN BAPTISTE (F)) 21 October 1999 (1999-10-21) claim 3	1-22
X	WO 02/12502 A (CENTOCOR INC) 14 February 2002 (2002-02-14) figure SEQ	1-22
X	WO 00/12562 A (GENENTECH INC) 9 March 2000 (2000-03-09) figure 2	22
X	US 5 639 863 A (DAN MICHAEL D) 17 June 1997 (1997-06-17) figure SEQ	22
X	WO 02/084277 A (ABMAXIS INC ;LUO PEIZHI (US)) 24 October 2002 (2002-10-24) figure 8	22
A	HENSEL FRANK ET AL: "Regulation of the new coexpressed CD55 (decay-accelerating factor) receptor on stomach carcinoma cells involved in antibody SC-1-induced apoptosis" LABORATORY INVESTIGATION, vol. 81, no. 11, November 2001 (2001-11), pages 1553-1563, XP008029819 ISSN: 0023-6837 the whole document	1-71
P,X	POHLE TINA ET AL: "Lipoptosis: Tumor-specific cell death by antibody-induced intracellular lipid accumulation" CANCER RESEARCH, vol. 64, no. 11, 1 June 2004 (2004-06-01), pages 3900-3906, XP002324184 ISSN: 0008-5472 the whole document	1-71

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP2004/012970

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03076472	A	18-09-2003	DE 10210427 A1 AU 2003214537 A1 CA 2478116 A1 EP 1485415 A2 WO 03076472 A2	09-10-2003 22-09-2003 18-09-2003 15-12-2004 18-09-2003
WO 9953051	A	21-10-1999	AU 764571 B2 AU 3050199 A CA 2319089 A1 EP 1068312 A2 WO 9953051 A2 JP 2002511259 T US 6822072 B1	21-08-2003 01-11-1999 21-10-1999 17-01-2001 21-10-1999 16-04-2002 23-11-2004
WO 0212502	A	14-02-2002	US 2003049725 A1 AU 7922701 A BR 0113110 A CA 2419205 A1 CN 1468308 A EP 1309691 A2 HU 0302376 A2 JP 2004523209 T MX PA03001231 A NO 20030620 A NZ 524147 A PL 360438 A1 WO 0212502 A2 US 2004120952 A1 ZA 200301856 A	13-03-2003 18-02-2002 16-09-2003 14-02-2002 14-01-2004 14-05-2003 28-10-2003 05-08-2004 15-10-2003 31-03-2003 25-02-2005 06-09-2004 14-02-2002 24-06-2004 21-06-2004
WO 0012562	A	09-03-2000	AT 217889 T AU 766551 B2 AU 5692399 A BR 9913435 A CA 2341276 A1 CN 1317015 A DE 69901569 D1 DE 69901569 T2 DK 1107996 T3 EP 1107996 A1 ES 2177316 T3 JP 2002523081 T NZ 509430 A PT 1107996 T WO 0012562 A1 US 6624295 B1 ZA 200100681 A	15-06-2002 16-10-2003 21-03-2000 25-09-2001 09-03-2000 10-10-2001 27-06-2002 19-12-2002 16-09-2002 20-06-2001 01-12-2002 30-07-2002 26-04-2002 31-10-2002 09-03-2000 23-09-2003 24-01-2002
US 5639863	A	17-06-1997	AT 205532 T AU 686394 B2 AU 2709295 A CA 2192079 A1 WO 9535374 A1 CN 1151184 A ,C DE 69522689 D1 DE 69522689 T2 EP 0766736 A1 JP 10501411 T	15-09-2001 05-02-1998 15-01-1996 28-12-1995 28-12-1995 04-06-1997 18-10-2001 08-08-2002 09-04-1997 10-02-1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/012970

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5639863	A	NO 965395 A NZ 288157 A	17-12-1996 29-09-1999
WO 02084277	A	24-10-2002	
		CA 2443862 A1	24-10-2002
		EP 1390741 A1	25-02-2004
		WO 02084277 A1	24-10-2002
		US 2003054407 A1	20-03-2003
		US 2002177170 A1	28-11-2002
		US 2003022240 A1	30-01-2003
		US 2004010376 A1	15-01-2004
		US 2004133357 A1	08-07-2004

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21		4 H 0 4 5	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A		
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	B		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02			
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 P 35/00			
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 K 47/48			
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A		
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/577	B		
	C 1 2 P 21/08			

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. ウィンドウズ
2. WINDOWS

(72)発明者 ミューラー - ヘルメリンク ハンス - コンラート

ドイツ連邦共和国 9 7 0 8 2 ヴェルツブルグ ハイน์リッヒ - ツォイナー - シトラーセ 7 2

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 CA04 CA20 DA02 EA02 EA04 GA04 GA09
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA93X AA94X AB01 AB06 AC14 BA02
 BB12 BB23 BB25 BB37 BC03 BC07 BD22 BD45 CA25 CA44
 CA46
 4C076 EE41A
 4C084 AA02 BA01 BA20 DA27 NA14 ZB262
 4H045 AA11 AA30 DA76 EA20 EA50 FA74