(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2004-520287
(P2004-520287A)
(43)公表日　平成16年7月8日(2004.7.8)

| (51)Int.Cl.[7] | F I | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|
| A61K 39/395 | A61K 39/395 | D | 4C084 |
| A61K 35/16 | A61K 39/395 | N | 4C085 |
| A61K 38/00 | A61K 39/395 | Y | 4C087 |
| A61K 48/00 | A61K 35/16 | | |
| A61P 13/10 | A61K 48/00 | | |

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 162 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2002-545557(P2002-545557)
(86)(22)出願日　平成13年11月28日(2001.11.28)
(85)翻訳文提出日　平成15年5月26日(2003.5.26)
(86)国際出願番号　PCT/US2001/044813
(87)国際公開番号　WO2002/043570
(87)国際公開日　平成14年6月6日(2002.6.6)
(31)優先権主張番号　09/724,620
(32)優先日　平成12年11月28日(2000.11.28)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　501149684
ユニバーシティ　オブ　バージニア　パテント　ファウンデーション
アメリカ合衆国，バージニア　２２９０３－２４４２，シャルロッツビル，スイート　１－１１０，ウエスト　メイン　ストリート　１２２４
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節
(74)代理人　100119183
弁理士　松任谷　優子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗Ｃ３ｂ（ｉ）抗体を用いる癌の予防および治療方法

(57)【要約】
本発明は動物の癌の治療および予防方法であって、該動物のC3b(i)に対して特異的な抗体を投与することを含んでなる方法に関する。本発明はまた、動物の癌の治療および予防方法であって、IgG抗体、IgM抗体、および/または補体成分を、C3b(i)に免疫特異的な抗体と組み合わせて1種以上の癌細胞抗原に免疫特異的に結合する抗体とを組み合わせて該動物に投与することを含んでなる方法にも関する。本発明はさらに、癌の治療および予防のための医薬組成物であって、C3b(i)に対して免疫特異的な1種以上の抗体および1種以上の癌細胞抗原に対して免疫特異的な1種以上の抗体を含んでなる医薬組成物にも関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
動物の癌に伴う1種以上の症状の改善に用いるための組成物であって、該組成物が1種以上の抗C3b(i)抗体、およびHerceptin(登録商標)、Retuxan(登録商標)、OvaRex、Panorex、BEC2、IMC-C225、Vitaxin、Campath I/H、Smart MI95、LymphoCide、Smart ID10、またはOncolymの予防上または治療上有効な量を含んでなるものである、組成物。
【請求項２】
IgGを濃厚化した血漿をさらに含んでなる、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
IgMを濃厚化した血漿をさらに含んでなる、請求項１または２に記載の組成物。
【請求項４】
1種以上の補体成分をさらに含んでなる、請求項１または２に記載の組成物。
【請求項５】
1種以上の補体成分をさらに含んでなる、請求項３に記載の組成物。
【請求項６】
動物の癌に伴う1種以上の症状の改善に用いるための組成物であって、該組成物が1種以上の抗C3b(i)抗体をコードする1種以上の核酸配列、およびHerceptin(登録商標)、Retuxan(登録商標)、OvaRex、Panorex、BEC2、IMC-C225、Vitaxin、Campath I/H、Smart MI95、LymphoCide、Smart ID10、またはOncolymをコードする1種以上の核酸配列の予防上または治療上有効な量を含んでなるものである、組成物。
【請求項７】
1種以上の補体成分をコードする1種以上の核酸配列をさらに含んでなる、請求項６に記載の組成物。
【請求項８】
IgGを濃厚化した血漿をさらに含んでなる、請求項６または７に記載の組成物。
【請求項９】
IgMを濃厚化した血漿をさらに含んでなる、請求項６に記載の組成物。
【請求項１０】
IgMを濃厚化した血漿をさらに含んでなる、請求項８に記載の組成物。
【請求項１１】
1種以上の補体成分をコードする1種以上の核酸配列をさらに含んでなる、請求項８に記載の組成物。
【請求項１２】
少なくとも1種の抗C3b(i)抗体が、癌細胞に結合したIgMまたはIgGに連結されたC3b(i)に対して免疫特異的である、請求項１または６に記載の組成物。
【請求項１３】
少なくとも1種の抗C3b(i)抗体が、癌細胞上のタンパク質または脂質に連結されたC3b(i)に対して免疫特異的である、請求項１または６に記載の組成物。
【請求項１４】
少なくとも1種の抗C3b(i)抗体が、モノクローナル抗体またはFabフラグメントである、請求項１または６に記載の組成物。
【請求項１５】
少なくとも1種の抗C3b(i)抗体が、C3b(i)およびエフェクター細胞レセプターまたは抗原に対して免疫特異的な二重特異的抗体である、請求項１または６に記載の組成物。
【請求項１６】
エフェクター細胞が、リンパ球、単球、マクロファージ、樹状細胞、好中球、ナチュラルキラー細胞、または赤血球である、請求項１５に記載の組成物。
【請求項１７】
エフェクター細胞が赤血球である、請求項１６に記載の組成物。
【請求項１８】

抗原がCR1、CR2、CR3、CR4、CD16、CD32、CD64、またはCD89である、請求項１７に記載の組成物。
【請求項１９】
二重特異的抗体がex vivoでエフェクター細胞と結合する、請求項１５に記載の組成物。
【請求項２０】
少なくとも1種の抗C3b(i)抗体が治療用剤とコンジュゲートされたものである、請求項１に記載の組成物。
【請求項２１】
動物がヒトである、請求項１または６に記載の組成物。
【請求項２２】
モノクローナル抗体がヒトモノクローナル抗体またはヒト化モノクローナル抗体である、請求項１または６に記載の組成物。
【請求項２３】
少なくとも1種の抗体がRetuxan(登録商標)である、請求項１または６に記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
1．緒言
本発明は動物の癌の治療および予防方法であって、該動物のC3b(i)に対して特異的な抗体を投与することを含んでなる方法に関する。本発明はまた、動物の癌の治療および予防方法であって、該動物のIgG抗体、IgM抗体、および/または補体成分を、C3b(i)に免疫特異的な抗体と組み合わせて投与することを含んでなる方法にも関する。本発明はまた、動物の癌の治療および予防方法であって、1種以上の癌細胞抗原に対して免疫特異的に結合する該動物の抗体を、C3b(i)に対して免疫特異的な抗体と組み合わせて投与することを含んでなる方法にも関する。本発明はさらに、癌の治療および予防のための医薬組成物であって、C3b(i)に対して免疫特異的な1種以上の抗体および1種以上の癌細胞抗原に対して免疫特異的な1種以上の抗体を含んでなる医薬組成物にも関する。
【背景技術】
【０００２】
2．発明の背景
補体系は約21種類の血漿タンパク質からなっており、ヒトの免疫系で感染に対する抵抗、および組織損傷の病因の双方において重要な役割を果たしている。補体系の活性化された産物は貪食細胞を引き寄せ、オプソニン化による外来性粒子の取り込みと破壊を非常に促進する。補体の活性化には2つの別々の経路である古典的経路と第二経路があり、それらによってC3のC3bへの変換とそれに続く反応(例えば、膜傷害複合体(membrane attack complex：MAC)の形成)がもたらされる。古典的経路の活性化は、抗原-抗体複合体または細胞性もしくは粒子性抗原に結合した抗体によって開始される。第二経路は抗体とは無関係に活性化されるがそれは細菌壁構成物質、細菌のリポ多糖(LPS)、および酵母の細胞壁構成成分(zymogen)などの病原体中の複合多糖によって活性化される。
【０００３】
補体の古典的経路は、IgGまたはIgM抗体を含んでいる免疫複合体へのC1の結合によって開始される。活性化されたC1はC2とC4を活性成分であるC2aとC4bに切断する。C4b2a複合体はC3転換酵素と呼ばれる活性なプロテアーゼであり、C3をC3aとC3bに切断する。C3bはC4b2aと複合体を形成してC4b2a3bが作られ、それはC5をC5aとC5bに切断する。C5bはC6と結合し、C5b6複合体はC7と結合して三者の複合体であるC5b67を形成する。C5b67複合体はC8と結合してC5b678複合体を形成し、それが今度はC9を結合し、C5-C9 MACの生成をもたらす。細胞膜にMACが挿入されると膜貫通チャンネルが形成され、それが細胞の溶解を生じさせる。
【０００４】
第二経路においては、C3からC3b(またはC3i)への転換によってB因子と結合しうる産物が

産生され、C3bB(またはC3iB)ができる。これらの複合体はD因子の影響を受けてC3bBbを作り、それはより多くのC3をC3bへと切断することができるC3転換酵素であり、より多くのC3bBb、さらにより多くのC3転換へと導く。特定の条件下では、C3bBb複合体は正の調節剤であるプロパージンがC3bおよびBbと結合することによって安定化される。C3転換酵素は別のもう一つのC3bサブユニットと結合してC5転換酵素C3bBbC3bを形成することができ、祖１れはC5-C9 MACの産生に活性を有する。

【０００５】

古典的経路および第二経路の双方において、補体の活性化に決定的に重要なステップはC3のC3bおよびC3aフラグメントへの蛋白分解酵素による転換である。C3aはチャレンジ部位に肥満細胞を誘引するアナフィラトキシンであり、その結果、ヒスタミンの局所的放出、血管拡張、およびその他の炎症作用が起こる。発生期のC3bはそれが生じた部位の周囲の表面との結合能を有し、C3レセプターのリガンドとして機能して例えば貪食作用に介在する。

【０００６】

正常状態では補体に対して暴露されている内在性の細胞表面は、崩壊促進因子("DAF")、C59("プロテクチン")、MCP、および可溶性C1インヒビター、またはC1NHなどの膜に結合した調節剤によって保護されている。DAFとMCPはC3bの産生を制限しており、C3bからの不活性型C3b、C3bi、およびC3dgの生成が確保される。CD59はMACの攻撃を防止するが、MACは層でなければ癌細胞を破壊する。C1インヒビターはC1、C1r、およびC1sの活性サブコンポーネントと結合し、それらの活性を阻害する。

【０００７】

2.1. 癌治療

予防法と早期発見の進歩、手術手技の改善、およびアジュバント放射線療法とアジュバント化学療法の改良が行われてきているが、多数の癌患者を治癒させることは依然として困難である。このことは特に、米国人男性では依然として最も主要な内臓腫瘍である前立腺癌に関して言えることであり、1999年には約180,000例の新たな症例とほぼ40,000例の死亡例が予測されている(Landisら, 1999, Cancer J. Clin. 49:8-31)。前立腺癌の治療における継続的挑戦は、再発性のもの、転移してきたもの、およびホルモン治療に抵抗性のものの効果的管理と根絶であり、これらは前立腺癌に特異的な極めて高い罹患率と死亡率の主な原因である(Small, 1998, Drugs and Aging 13:71-81)。

【０００８】

前立腺とその他の癌に対しての現在研究中の多数の治療様式は抗ガン剤の組織特異的な送達に依存したものである。免疫療法的アプローチのある方法は、細胞傷害性薬剤を特定の癌細胞エピトープに対して特異的なモノクローナル抗体(mAb)とコンジュゲートさせることを含む。この方法では、治療用薬剤は高い治療的投与量を腫瘍部位へ直接的に、および選択的に送達することができ、それによって健康な組織への傷害を最小限とすることができる(Bachら, 1993, Immunol. Today 14:421-5; Reithmullerら, 1993, Cur.Op. Immunol 5:732-9; およびGruberら, 1996, Spring Sem. Immunopath. 18:243-51)。この方法では、まず癌のタイプ毎に特異的なエピトープを同定することが必要である。そのような候補となるエピトープは正常細胞に比べ癌細胞上で非常に高レベルで発現されていなければならない。第2に、この方法ではそれらのエピトープに特異的な高アフィニティーmAbを開発する必要があり、それらのmAbは自己組織との交叉反応性は最小限のものでなければならない。mABによる殺滅の生物学的機作は様々であり、癌細胞上に同定されるエピトープ、およびその特異的mABのアイソタイプのエフェクター機能に依存する。しかし、抗原性の改変、および/または変異によって、癌細胞はその細胞あたりの標的エピトープの利用可能なレベルを減らしたり、あるいは標的エピトープをその表面から全く除去することができる。このように、癌の診断と治療へのmABの使用は依然として問題が多い。

【０００９】

mAbを用いた癌治療をより広範に適用可能なものとするためには、実質的に全ての癌細胞上に存在する遍在性の抗原部位を同定し、次いでこの抗原に対して特異的なmAbのパネル

を作ることであろう。非常に多数の文献で癌細胞が特定の共通の特徴を共有していることが明らかとされている。ヒトの癌細胞の多くのタイプのものはその細胞表面タンパク質および脂質の糖鎖付加パターンにかなりの異常があることによって特徴づけられる(Hakomoriら, 1996, Canc. Res. 56:5309-18; Castronovoら, 1989, J. Nat. Canc. Inst. 81:212-6; Springerら, 1984, Science 224:1198-206; およびSpringerら, 1997, J. Mol. Med. 75:594-602)。これらの相異によって癌細胞上の抗原決定基の同定を行うことができるようになり、そのような抗原決定基は正常細胞上での発現ははるかに低レベルである。それらのエピトープに対する天然のIgM抗体は循環血液中に存在し、そのIgM抗体とそれらの癌細胞表面抗原との相互作用によって補体が活性化され、補体活性化産物(C3bおよびその断片、それらをまとめてC3b(i)と呼ぶ)の共有結合による腫瘍細胞への結合がもたらされる(Okadaら, 1974, Nature 248;521-25; Irieら, 1974, Science 186:454-456; Desaiら, 1995, J. Immunol. Methods 188:175-85; Vetvickaら, 1996, J. Clin. Invest. 98:50-61; Vetvickaら, 1997, J. Immunol. 159:599-605; およびVetvickaら, 1999, Clin. Exp. Immunol. 115:229-35)。癌細胞上には比較的大量のC3b(i)が沈着しうるが、同時に高レベルで発現された膜関連補体制御タンパク質(例えば、崩壊促進因子("DAF")、膜補助因子タンパク("MCP")、および特に"プロテクチン"すなわちCD59)が、通常は補体が介在する溶解を防ぐ(Chenungら, 1988, J. Clin. Invest. 81:1122-8; Gorterら, 1996, Lab. Invest. 74:1039-49; Maenpaaら, 1996, Am. J. Path. 148;1139-52; およびLiら, 1997, Int. J. Canc. 71:1049-55)。さらに、研究者の何人かは、大多数の場合、癌患者は潜在的防護能を持つIgM抗体のレベルがかなり低下していることを確認している。従って、多くの場合、癌細胞は補体活性化によっては容易に殺されないが、それは防護的IgM抗体のレベルが低下し、癌細胞の表面上のヒト補体制御タンパク質の発現が増大しているからである。

【００１０】

2.2 感染における補体の役割

生来の免疫はヒトおよび大多数の動物が外来性物に対して免疫応答が開始される前ですら応答できるようにしている。生来の免疫の最も重要な様相の１つは補体系が関与するものである(Cooper, N. R. 「補体とウイルス」"Complement and viruses", Volanakis, J. B. とFrank, M. M. 「健康状態と疾病状態におけるヒト補体系」"The Human Complement System in Health and Disease", 18, 393-408(1998) New York, Marcel Dekker, Inc.; およびPetry, F.およびLoos, M. 「細菌と補体」"Bacteria and complement" Volanakis, I. E. とFrank, M. M. 「健康状態と疾病状態におけるヒト補体系」"The Human Complement System in Health and Disease", 171, 375-392(1998) New York, Marcel Dekker, Inc.)。免疫を受けたことがない個体で広範な細菌、ウイルス、およびその他の微生物が補体を活性化させることは多数報告されている(Petersonら, 1978, Infect. Immun. 19:943; Verbrughら, 1982, J. Immunol. 129:1681; Newmanら, 1985, J. Exp. Med. 161:1414; Seelenら, 1995, Immunol. 84:653; Wagnerら, 1998, J. Immunol. 160:1936; Bakkerら, 1992, AIDS 6:35; Hiavacekら, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 96:14681; Schmitzら, 1994, J. Immunol. 153:1352; Tacnet-Delormeら, 1999, J. Immunol. 162:4088; Jolingら, 1993, J. Immunol. 150:1065; Dominguezら, 1999, J. Exp. Med. 189:25; およびWashburnら, 1991, Molec. Immunol. 28:465)。そのようなものとしては、限定するものではないが、グラム陽性および陰性の細菌、AIDSの原因ウイルスであるHIVが含まれる。補体活性化の結果として、これらの生物体は、補体活性化フラグメント、および特にC3b(i)と共有結合で標識される。さらに、これらの病原体に既に暴露(免疫処置、または以前の感染によって)されたことのある個体では、特異的な抗体がその病原体と結合し、補体を活性化し、C3b(i)の沈着を促進させる。多くの場合この補体活性化が究極的にはその微生物の排除と破壊をもたらすとはいえ、場合によってはC3b(i)で標識された侵入者は循環血液中に留まり、感染しやすい組織や器官に感染することもできる。事実、微生物がそれに共有結合で結合したC3b(i)分子を実際に用いて細胞(その細胞はC3bCiに対するレセプターを有している)内への侵入を果たし、実効性のある感染が起こされた実例が多数ある(Bakkerら, 1992, AIDS 6:35; Tacnet-Delormeら, 1999, J. Immunol. 162:4088; Cooper, N.

R.「補体とウイルス」"Complement and viruses", Volanakis, J. B. とFrank, M. M.「健康状態と疾病状態におけるヒト補体系」"The Human Complement System in Health and Disease", 18, 393-408(1998) New York, Marcel Dekker, Inc.; およびPetry, F.およびLoos, M.「細菌と補体」"Bacteria and complement" Volanakis, I. E. とFrank, M. M.「健康状態と疾病状態におけるヒト補体系」"The Human Complement System in Health and Disease", 171, 375-392(1998) New York, Marcel Dekker, Inc.)。いくつかの方面の実験結果はC3b(i)でオプソニン化されたHIVが体内で樹状細胞の表面上に結合された形で非常に長期間保持されうることが示されており、この細胞に結合したHIVが体内からのHIVの完全な排除の主な障害の１つとなっているのかもしれない(Hiavacekら, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 96:14681; およびSchmitzら, 1994, J. Immunol. 153:1352)。

【００１１】

この節または本出願の全ての節における参照文献の引用はその参照文献が本発明の先行技術であることを認めたものと解釈すべきではない。

【発明の開示】

【００１２】

3. 発明の要旨

本発明はC3b(i)に免疫特異的な抗体を含んでなる組成物、およびそのような組成物を動物に投与することを含んでなる動物の癌の治療および予防のための方法を包含する。特に、本発明は、治療上または予防上有効な量の、C3b(i)に免疫特異的な抗体、第2の分子(例えば、IgM抗体、IgG抗体、糖タンパク質、もしくは糖脂質)に連結させた(例えば共有結合で連結させた)C3b(i)に免疫特異的な抗体、C3b(i)に免疫特異的な抗体をコードする核酸配列、または第2の分子に連結させた(例えば共有結合で連結させた)C3b(i)に免疫特異的な抗体をコードする核酸配列を動物に投与することを含んでなる動物の癌を治療もしくは予防する方法を提供する。本発明はまた、IgG抗体、IgM抗体、および/または補体成分を抗C3b(i)抗体と組み合わせて動物に投与することを含んでなる動物の癌を治療もしくは予防する方法をも提供する。本発明はまた、1種以上の癌細胞抗原を抗C3b(i)抗体と組み合わせて動物に投与することを含んでなる動物の癌を治療もしくは予防する方法をも提供する。

【００１３】

本発明はまた、C3b(i)もしくは第2の分子に連結されたC3b(i)に免疫特異的な1種以上の抗体を、動物の癌の治療もしくは予防に有効な量含んでなる組成物をも提供する。本発明はまた、C3b(i)もしくは第2の分子に連結されたC3b(i)に免疫特異的な1種以上の抗体をコードする1種以上の核酸分子を、動物の癌の治療もしくは予防に有効な量含んでなる組成物をも提供する。本発明はさらに、C3b(i)もしくは第2の分子に連結されたC3b(i)、およびエフェクター細胞のレセプターもしくは抗原に免疫特異的な、1種以上の二重特異性抗体を、動物の癌の治療もしくは予防に有効な量含んでなる組成物をも提供する。

【００１４】

3.1. 定義

本明細書で用いている「C3b(i)」という用語は、C3bおよびそのフラグメントを意味し、限定するものではないが、C3b(i)、C3b、およびC3dを含む。特定の実施形態においては、「C3b(i)」はC3bを意味する。別の実施形態においては「C3b(i)」はC3b(i)を意味する。また別の実施形態においては「C3b(i)」はC3dg、またはC3dgに対応するC3bもしくはC3b(i)のフラグメントを意味しない。

【００１５】

本明細書で用いている「C3b(i)に免疫特異的な抗体(単数)」、「C3b(i)に免疫特異的な抗体(複数)」「C3b(i)特異的抗体」「抗C3b(i)抗体」および類似の用語は、C3b(i)、C3b(i)のフラグメント、第2の分子に連結された(例えば共有結合で)C3b(i)、第2の分子に連結された(例えば共有結合で)C3b(i)に無関係なポリペプチドに非特異的に結合しない1種以上の抗体を意味する。抗C3b(i)抗体は、その他の非C3b(i)抗原と交叉反応してもよい。好ましくは、抗C3b(i)抗体は、他の抗原と交叉反応しない。抗C3b(i)抗体は、例えば、イムノ

アッセイもしくは当業者には既知のその他の技術によって同定することができる。好ましい実施形態においては、抗C3b(i)抗体は第2の分子に共有結合で連結されたC3b(i)に免疫特異的に結合する。別の実施形態においては、抗C3b(i)抗体はC3b(i)でオプソニン化された癌細胞に優先的に結合し、環境中のC3b(i)には結合しない。別の好ましい実施形態においては、抗C3b(i)抗体はウイルス上または微生物上に沈着したC3b(i)に優先的に結合し、環境中のC3b(i)には結合しない。

【００１６】

特定の実施形態においては、C3b(i)が連結される「第2の分子」は、例えば癌細胞によって特異的にまたは優先的に発現される、タンパク質、糖タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、もしくは糖脂質などの癌細胞抗原である。別の特定の実施形態においては、C3b(i)が連結される「第2の分子」は微生物抗原もしくはウイルス抗原である。好ましくは、C3b(i)は第2の分子に共有結合で連結されている。

【００１７】

本明細書で用いている「1種以上の癌抗原、ウイルス抗原、もしくは微生物抗原に免疫特異的な抗体」という用語およびそれに類似のものは、癌抗原、ウイルス抗原、もしくは微生物抗原と免疫特異的に結合するがその他のポリペプチドには非特異的に結合はしない抗体を意味する。癌抗原、ウイルス抗原、もしくは微生物抗原と免疫特異的に結合する抗体はその他の抗体と交差反応性のものとすることができる。好ましくは、癌抗原、ウイルス抗原、もしくは微生物抗原と免疫特異的に結合する抗体は、その他の抗原と交叉反応しないものである。癌抗原、ウイルス抗原、もしくは微生物抗原と免疫特異的に結合する抗体は、例えば、イムノアッセイまたは当業者には既知のその他の技術によって同定することができる。

【００１８】

本明細書で用いている「フラグメント」という用語は、癌細胞ペプチドもしくはもしくはポリペプチド(例えば、癌細胞上で優先的に、もしくは特異的に発現されているペプチドもしくはポリペプチド)、ウイルスペプチドもしくはポリペプチド、微生物のペプチドもしくはポリペプチド、またはC3b(i)に免疫特異的に結合する抗体の少なくとも5個の連続したアミノ酸残基のアミノ酸配列、少なくとも10個の連続したアミノ酸残基のアミノ酸配列、少なくとも15個の連続したアミノ酸残基のアミノ酸配列、少なくとも20個の連続したアミノ酸残基のアミノ酸配列、少なくとも25個の連続したアミノ酸残基のアミノ酸配列、少なくとも40個の連続したアミノ酸残基のアミノ酸配列、少なくとも50個の連続したアミノ酸残基のアミノ酸配列、少なくとも60個の連続したアミノ酸残基のアミノ酸配列、少なくとも70個の連続したアミノ酸残基のアミノ酸配列、少なくとも80個の連続したアミノ酸残基のアミノ酸配列、少なくとも90個の連続したアミノ酸残基のアミノ酸配列、少なくとも100個の連続したアミノ酸残基のアミノ酸配列、少なくとも125個の連続したアミノ酸残基のアミノ酸配列、少なくとも150個の連続したアミノ酸残基のアミノ酸配列、少なくとも175個の連続したアミノ酸残基のアミノ酸配列、少なくとも200個の連続したアミノ酸残基のアミノ酸配列、少なくとも250個の連続したアミノ酸残基のアミノ酸配列を含んでなるペプチドもしくはポリペプチドを意味する。

【００１９】

本明細書で用いている「融合タンパク質」という用語は、ある抗体もしくはそのフラグメントのアミノ酸配列、および異種ポリペプチド(すなわち、無関係のポリペプチド)のアミノ酸配列を含んでなる1つのポリペプチドを意味する。

【００２０】

本明細書で用いている「宿主細胞」という用語は、ある核酸分子でトランスフェクトされた特定の細胞およびその細胞の子孫もしくは子孫となる可能性のあるものを意味する。そのような細胞の子孫は、継代中に生じうる突然変異もしくは環境の影響、または該核酸分子の宿主細胞ゲノム中への組み込みによって、該核酸分子でトランスフェクトされた親の細胞とは同一でない可能性がある。

【００２１】

「単離された」もしくは「精製された」抗体もしくはポリペプチドとは、そのタンパク質が由来した細胞もしくは組織ソースからの細胞性物質もしくはその他の夾雑タンパク質を実質的に含まないか、または化学的に合成されたものである場合には化学前駆体もしくはその他の化学物質を実質的に含まないものである。「細胞性物質を実質的に含まない」という表現は、抗体もしくはポリペプチドがそれが単離されたもしくは組換え技術によって産生された細胞の細胞性成分から分離された状態である抗体もしくはポリペプチドの調製物を含むものである。従って、細胞性物質を実質的に含まない抗体もしくはポリペプチドには、約30%、20%、10%、もしくは5%(乾燥重量で)未満の異種タンパク質(本明細書では「夾雑タンパク質」とも呼ぶ)を有する抗体もしくはポリペプチドの調製物を含んでいる。該抗体もしくはポリペプチドが組換えで産生されたものである場合には、培地を実質的に含まない、すなわち、そのタンパク質調製物の体積の約20%、10%、もしくは5%未満であることが好ましい。該抗体もしくはポリペプチドが化学合成で製造されたものである場合には、化学前駆体もしくはその他の化学物質を実質的に含まない、すなわち、該タンパク質の合成に関わる化学前駆体もしくはその他の化学物質から分離されていることが好ましい。従って、そのような抗体もしくはポリペプチドの調製物は、所望の抗体もしくはポリペプチドフラグメント以外の化学前駆体もしくは化合物を約30%、20%、10%、5%(乾燥重量で)未満有している。好ましい実施形態においては、本発明の抗体は単離されたものまたは精製されたものである。

【００２２】

「単離された」核酸分子とは該核酸分子の天然のソース中に存在する他の核酸分子から分離されたものである。さらに、「単離された」核酸分子、例えばcDNA分子などは、細胞性物質を実質的に含まない、または組換え技術によって産生させた場合には培地を実質的に含まない、または化学的に合成した場合には化学前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まないものとすることができる。好ましい実施形態においては、本発明の抗体をコードする核酸分子は単離されたもの、または精製されたものである。

【００２３】

本発明の特定の実施形態においては、「予防的上有効な量」とは、動物の癌、ウイルス感染、微生物感染、もしくは敗血症性ショックの発生を低減するような本発明の組成物の量である。好ましくは、動物の癌、ウイルス感染、微生物感染、もしくは敗血症性ショックの発生が本発明の組成物を投与された動物では本発明の組成物を投与しなかった動物もしくは動物群(例えば、2匹、3匹、5匹、10匹もしくはそれ以上の動物)と比較して、少なくとも2.5%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも25%、少なくとも35%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、もしくは少なくとも99%低減されることが好ましい。

【００２４】

本発明の特定の実施形態においては、「治療上有効な量」とは、動物の癌、ウイルス感染、微生物感染、もしくは敗血症性ショックの重篤度、罹患期間、および／または症状を低下させるような本発明の組成物の量である。本発明の他の特定の実施形態においては、「治療上有効な量」とは、本発明の組成物を投与された動物では本発明の組成物を投与しなかった動物もしくは動物群(例えば、2匹、3匹、5匹、10匹もしくはそれ以上の動物)と比較して、少なくとも2.5%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも25%、少なくとも35%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、もしくは少なくとも99%のウイルス力価もしくは微生物力価の低下をもたらす本発明の化合物の量である。本発明の別の特定の実施形態においては、「治療上有効な量」とは、本発明の組成物を投与された動物では本発明の組成物を投与しなかった動物もしくは動物群(例えば、2匹、3匹、5匹、10匹もしくはそれ以上の動物)と比較して、少なくとも2.5%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも25%、少なくとも35%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、もしくは少なくとも99%の癌の増殖もしくは拡散の低下をもたらす本発明の化合物の量である。

【発明を実施するための最良の形態】
【００２５】
5. 発明の詳細な説明
本発明は、C3b(i)に免疫特異的な1種以上の抗体を含んでなる組成物、および癌、ウイルス感染、微生物感染、もしくは敗血症性ショックの治療および予防におけるそのような組成物の使用を包含する。本発明は、動物の癌、ウイルス感染、微生物感染、もしくは敗血症性ショックを治療または予防する方法を提供し、該方法は該動物に、C3b(i)または第2の分子に連結させたC3b(i)に免疫特異的な1種以上の抗体の治療上または予防上有効な量を投与することを含んでなる。本発明は、動物の癌、ウイルス感染、微生物感染、もしくは敗血症性ショックを治療または予防する方法を提供し、該方法は該動物に、IgG抗体、IgM抗体、および/または1種以上の補体成分を、C3b(i)もしくは第2の分子に連結させたC3b(i)に免疫特異的な1種以上の抗体の治療上または予防上有効な量と組み合わせて投与することを含んでなる。本発明は、動物の癌、ウイルス感染、微生物感染、もしくは敗血症性ショックを治療または予防する方法を提供し、該方法は該動物に、1種以上の癌抗原、ウイルス抗原、または微生物抗原に免疫特異的な1種以上の抗体を、C3b(i)もしくは第2の分子に連結させたC3b(i)に免疫特異的な1種以上の抗体と組み合わせて投与することを含んでなる。本発明はさらに、動物の敗血症性ショックを治療または予防する方法を提供し、該方法は該動物に、リポ多糖(LPS)、エンドトキシン、またはグラム陰性細菌の外壁(例えば、大腸菌(E.coli)の外壁)の1構成成分に免疫特異的な1種以上の抗体を、C3b(i)もしくは第2の分子に連結させたC3b(i)に免疫特異的な1種以上の抗体と組み合わせて投与することを含んでなる。
【００２６】
本発明では、C3b(i)に免疫特異的な抗体が動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに、癌、ウイルス感染、微生物感染、または敗血症性ショックを治療または予防するために投与される。本発明の抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、二重特異的抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、sFvs、イディオタイプ抗体、Fabフラグメント、およびF(ab')フラグメント、Fab発現ライブラリーによって産生されたフラグメント、ならびにエピトープ結合フラグメントが含まれる。特定の実施形態においては、C3b(i)に免疫特異的なモノクローナル抗体が動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに、癌、ウイルス感染、微生物感染、または敗血症性ショックを治療または予防するために投与される。好ましい実施形態においては、第2の分子(例えば、IgM抗体、IgG抗体、糖タンパク質もしくは糖脂質)と共有結合で結合した、C3b(i)に免疫特異的なモノクローナル抗体は動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに、癌、ウイルス感染、微生物感染、または敗血症性ショックを治療または予防するために投与される。別の実施形態においては、C3b(i)に免疫特異的なモノクローナル抗体が、抗生物質、化学療法用細胞毒、例えば細胞増殖抑止剤、または細胞破壊剤(例えば、パクリタキソール、サイトカラシンB、またはジフテリア毒素など)、血栓形成剤もしくは抗血管新生剤などの治療的部分、または放射性標識とコンジュゲートされる。別の実施形態においては、C3b(i)に免疫特異的なモノクローナル抗体は、例えば、酵素、蛍光マーカー、発光物質、生物発光物質、または放射性物質などの検出可能な物質とコンジュゲートされる。また別の実施形態においては、C3b(i)に免疫特異的なモノクローナル抗体の結合価は、例えば二量体またはIgM様五量体へと増加されている。
【００２７】
好ましい実施形態においては、C3b(i)とエフェクター細胞レセプターまたは抗原に免疫特異的な二重特異性抗体が動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに、癌、ウイルス感染、微生物感染、または敗血症性ショックを治療または予防するために投与される。本明細書で用いられる「エフェクター細胞」という用語は、細胞が介在する免疫応答に関与する細胞を意味する。エフェクター細胞の例としては、限定するものではないが、単球、マクロファージ、樹状細胞、好中球、ナチュラルキラー細胞、リンパ球、および赤血球が含まれる。実施形態においては、ex vivoで細胞表面レセプターを介してエフェクター細

胞に結合させた抗C3b(i)ヘテロ多量体構築物(二重特異性モノクローナル複合体)は、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに、癌、ウイルス感染、または微生物感染を治療または予防するために投与される。細胞表面のレセプターとしては、限定するものではないが、CR1、CR2、CR3、CR4、ヒトFcγレセプターCD16、CD32、およびCD64、ならびにIgAのためのFcレセプター、CD89が含まれる。好ましい実施形態においては、ex vivoでCR1を介して赤血球と結合させた抗C3b(i)ヘテロ多量体構築物は、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに、癌、ウイルス感染、微生物感染、または敗血症性ショックを治療または予防するために投与される。

【００２８】

好ましい実施形態においては、C3b(i)に免疫特異的な抗体フラグメントおよび補体成分である二重特異性抗体は、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに、癌、ウイルス感染、微生物感染、または敗血症性ショックを治療または予防するために投与される。この実施形態では、該二重特異性抗体は補体成分を補充することができる。別の実施形態においては、C3b(i)に免疫特異的な二重特異性抗体は、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに、癌、ウイルス感染、微生物感染、または敗血症性ショックを治療または予防するために投与される。二重特異性抗体の調製方法は米国特許第5,837,242号に述べられており、その全体を本明細書中に組み入れるものとする。

【００２９】

本発明は、IgG抗体および/またはIgM抗体を1種以上の抗C3b(i)抗体と組み合わせて動物に投与して、癌細胞、ウイルス、および微生物のオプソニン化を促進することを包含する。１つの実施形態においては、IgG抗体および/またはIgM抗体は、C3b(i)に免疫特異的な1種以上の抗体の投与に先立って、それに引き続いて、またはそれと同時に、動物に、癌、ウイルス感染、微生物感染、または敗血症性ショックを治療または予防するために投与される。好ましい実施形態においては、IgG抗体および/またはIgM抗体は、C3b(i)に免疫特異的な1種以上の抗体の投与に先立って、動物に、癌、ウイルス感染、微生物感染、または敗血症性ショックを治療または予防するために投与される。特別な実施形態においては、1種以上の癌細胞抗原に免疫特異的な1種以上の抗体が、C3b(i)に免疫特異的な1種以上の抗体の投与に先立って、それに引き続いて、またはそれと同時に、癌の治療または予防に有効な量、動物に投与される。好ましい実施形態においては、1種以上の癌細胞抗原に免疫特異的な1種以上の抗体は、C3b(i)に免疫特異的な1種以上の抗体の投与に先立って、癌の治療または予防に有効な量で、動物に投与される。癌細胞抗原の例としては、限定するものではないが、不適当に糖鎖付加された細胞表面タンパク質および脂質が含まれる。

【００３０】

特別な実施形態においては、癌化学療法に用いられる1種以上の抗体が、C3b(i)に免疫特異的な1種以上の抗体の投与に先立って、それに引き続いて、またはそれと同時に、癌の治療または予防に有効な量で、動物に投与される。好ましい実施形態においては、癌免疫学療法に用いられる1種以上の抗体が、C3b(i)に免疫特異的な1種以上の抗体の投与に先立って、癌の治療または予防に有効な量で、動物に投与される。癌免疫療法に用いられる抗体の例としては、限定するものではないが：Herceptin(登録商標)(Trastuzumab; Genentech, CA)、これは転移性乳癌患者の治療のためのヒト化抗HER-2モノクローナル抗体である；Retuxan(登録商標)(rituximab; Genentech)、これは非ホジキンリンパ腫患者の治療のためのキメラ抗CD20モノクローナル抗体である；OvaRex(AltaRex Corporation, MA)、これは卵巣癌治療のためのマウス抗体である；Panorex(Glaxo Wellcome, NC)、これは大腸直腸癌の治療のためのマウス$IgG_{2a}$抗体である；BEC2(ImClone Systems Inc., NY)、これは肺癌治療のためのマウスIgG抗体である；IMC-C225(ImClone Systems Inc., NY)、これは頭頚部癌の治療のためのキメラIgG抗体である；Vitaxin(MedImmune, Inc., MD)、これは肉腫の治療用のヒト化抗体である；Campath I/H(Leukosite, MA)、これは慢性リンパ性白血病(CLL)の治療のためのヒト化$IgG_1$抗体である；Smart MI95(Protein Design Labs, Inc., CA)、これは急性骨髄性白血病(AML)の治療のためのヒト化IgG抗体である；LymphoCide(Immunomedics, Inc., NJ)、これは非ホジキンリンパ腫の治療のためのヒト化IgG抗体

である；Smart ID10(Protein Design Labs, Inc., CA)、これは非ホジキンリンパ腫の治療のためのヒト化抗体である；Oncolym(Techniclone, Inc., CA)、これは非ホジキンリンパ腫の治療のためのマウス抗体である；モノクローナル抗体7E11、これは前立腺特異的膜抗原(PSMA; Linら, 1997, Cancer Res. 57:3629)に特異的に結合するものである；ならびにBeckman Coulter, Inc.,CAから販売されている抗CD20モノクローナル抗体が、含まれる。好ましい実施形態においては、本発明で用いる癌細胞抗原に免疫特異的な抗体はrituximabである。

【００３１】

特別な実施形態においては、1種以上の微生物抗原に免疫特異的な1種以上の抗体が、C3b(i)に免疫特異的な1種以上の抗体の投与に先立って、それに引き続いて、またはそれと同時に、ウイルス感染または微生物感染の治療または予防に有効な量、動物に投与される。ウイルス感染または微生物感染の治療または予防に用いられる抗体の例としては、限定するものではないが：Synagis(登録商標)(MedImmune, Inc., MD)、これはRSウイルス(RSV)感染患者の治療のためのヒト抗RSVモノクローナル抗体である；PRO542(Progenics)、これはHIV感染の治療のためのCD4融合抗体である；Ostavir(Protein Design Labs, Inc., CA)、これはB型肝炎ウイルス感染治療のためのヒト抗体である；Protovir(Protein Design Labs, Inc.,CA)、これはサイトメガロウイルス(CMV)の治療のためのヒト化$IgG_1$抗体である；WIN1、これはLPSと免疫特異的に結合する(Novardis)；ならびにマウスモノクローナル抗レジオネラ肺炎LPS(Research Diagnostics, Inc., NJ)が含まれる。

【００３２】

本発明は、IgGおよび/またはIgM抗体のソースとしての血漿と1種以上の抗C3b(i)抗体を、癌、ウイルス感染、および微生物感染の治療または予防のために投与することを包含している。特別な実施形態においては、血漿または選択的に濃縮したIgGおよび/またはIgM抗体は、1種以上の抗C3b(i)抗体の投与に先立って、それに引き続いて、またはそれと同時に、癌、ウイルス感染、または微生物感染の治療または予防に有効な量で、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに投与される。血漿または選択的に濃縮したIgGおよび/またはIgM抗体は、正常動物または特定のタイプの癌、特定のタイプのウイルス感染、または特定のタイプの微生物感染を有している動物から得ることができる。

【００３３】

好ましくは、該血漿または選択的に濃縮したIgGおよび/またはIgMは投与を受ける動物と同じ種から得たものである。該血漿は、補体経路をブロックするためにEDTA、クエン酸塩、またはヘパリンで処理されたものであっても、処理されていないものであっても良い。特別な実施形態においては、ある動物から得た血漿または選択的に濃縮したIgGおよび/またはIgM抗体、それは癌細胞抗原(例えば、不適当に糖鎖付加されたタンパク質または脂質)に免疫特異的な抗体を含有したものであるが、それらが抗C3b(i)抗体の投与に先立って動物に投与される。別の特別な実施形態においては、ある動物から得た血漿または選択的に濃縮したIgGおよび/またはIgM抗体、それはウイルス抗原または微生物抗原(例えば、抗HIV gp120抗体または抗LPS抗体)に免疫特異的な抗体を含有したものであるが、それらが抗C3b(i)抗体の投与に先立って動物に投与される。

【００３４】

本発明は、組換え補体成分または補体成分のソースとしての血漿と1種以上の抗C3b(i)抗体を、癌、ウイルス感染、微生物感染、および敗血症性ショックの治療または予防のために投与することを包含している。特別な実施形態においては、1種以上の補体成分または組換え補体成分が、C3b(i)に免疫特異的な抗体の投与に先立って、それに引き続いて、またはそれと同時に、癌、ウイルス感染、微生物感染、または敗血症性ショックの治療または予防に有効な量で、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに投与される。別の実施形態においては、補体成分のソースとしての正常血漿が、C3b(i)に免疫特異的な抗体の投与に先立って、それに引き続いて、またはそれと同時に、癌、ウイルス感染、微生物感染、または敗血症性ショックの治療または予防に有効な量で、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに投与される。

【００３５】
特別な実施形態においては、IgGおよび/またはIgM抗体ならびに補体成分のソース(例えば正常血漿)が、効率的なオプソニン化を起こさせるために、C3b(i)に特異的な抗体の投与に先立って投与される。本発明では、C3b(i)に免疫特異的な抗体を、IgG抗体、IgM抗体、および/または補体成分と組み合わせて投与することにより、補体活性の増大および究極的には癌細胞の殺滅をもたらす連鎖反応を開始させることとなる。
【００３６】
好ましい実施形態においては、ある動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトがIgG抗体、IgM抗体、および/または補体成分の投与を必要とするか確かめるために、IgG抗体、IgM抗体、および/または補体成分の体内レベルが分析される。当業者には既知の標準的な技術を、動物血清中のIgG抗体、IgM抗体、および補体成分の体内レベルを測定するために用いることができる。例えば、血清中のIgM抗体またはIgG抗体のレベルは、類似の癌細胞系統などの細胞系統に対してその血清を滴定することによって測定することができる。さらに、補体成分のレベルおよび補体活性は、例えば、補体タンパク質と相互作用する能力および特異的抗体でオプソニン化された標的細胞を溶解させる能力をin vitroで試験することによって測定することができる(「補体：実際的なアプローチ」"Complement: A Practical Approach", DoddsとSim, Oxford University Press, 1997; Makridesら, 1992, J. Biol. Chem. 264:2475-2476; およびWeisman, H. F.ら, 1990, Science, 244:146-151)。本発明はまた、癌、ウイルス、および微生物の、治療、予防、検出、または診断に用いるための、1種以上の抗C3b(i)抗体を含んでなる組成物をも提供する。
【００３７】
本発明は、C3b(i)特異的抗体を用いる、in vitroで癌細胞を減少させるための方法とキットを提供する。本発明はまた、C3b(i)に特異的な抗体を用いる、癌の検出、造影、および診断のための方法とキットをも提供する。さらに、本発明はC3b(i)に特異的な抗体を含んでなる医薬組成物を提供する。
【００３８】
5.1. IgGおよびIgMの濃縮
本発明の特定の実施形態では、ある動物の血清または血漿中のIgG抗体、IgM抗体、および補体成分のレベルは抗C3b(i)抗体の投与に先立って測定される。1つの実施形態においては、IgG抗体および/またはIgM抗体のレベルが低いことが判明した動物には、IgG抗体および/またはIgM抗体(好ましくは、1種以上の癌細胞エピトープ(癌細胞によって発現されている、不適当に糖鎖付加されたタンパク質または脂質)、ウイルスエピトープ、または微生物エピトープに結合するIgG抗体またはIgM抗体)を含有する正常血漿を、抗C3b(i)抗体の投与に先立って(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間前に)、それに引き続いて(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間後に)、またはそれと同時に、癌、ウイルス感染、または微生物感染の治療または予防のために投与される。この実施形態では、該血漿はその投与を受ける動物と同じ種から得たものである。別の実施形態においては、IgM抗体のレベルが低いことが判明した動物には、IgM抗体が濃縮された血漿が、抗C3b(i)抗体の投与に先立って(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間前に)、それに引き続いて(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間後に)、またはそれと同時に、癌、ウイルス感染、または微生物感染の治療または予防のために投与される。別の実施形態においては、IgG抗体のレベルが低いことが判明した動物には、IgG抗体が濃縮された血漿が、抗C3b(i)抗体の投与に先立って(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間前に)、それに引き続いて(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間後に)、またはそれと同時に、癌、ウイルス感染、または微生物感染の治療または予防のために投与される。これらの実施形態では、IgM

抗体またはIgG抗体は当業者には既知の標準的な技術を用いて選択的に濃縮される。そのような技術としては、限定するものではないが、クロマトグラフィー、遠心分離、および溶解度差（differential solubility）が挙げられる。

【００３９】

本発明の特別な実施形態においては、癌細胞、ウイルス、または微生物と免疫特異的に結合することが知られている天然のまたは組換えのIgG抗体、またはIgM抗体が、抗C3b(i)抗体の投与に先立って(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間前に)、それに引き続いて(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間後に)、またはそれと同時に、癌の治療または予防のために投与される。1種以上の癌細胞抗原(例えば、癌細胞によって発現される、不適当に糖鎖付加されたタンパク質または脂質)、ウイルス抗原(例えば、RSVの糖タンパク質F、およびHIVのgp120)、または微生物抗原(例えば、LPS)と免疫特異的に結合するIgG抗体、またはIgM抗体は市販品を購入するか、または当業者には既知の標準的なタンパク質精製技術を用いて精製することができる。標準的なタンパク質精製技術の例としては、限定するものではないが、ゲルによる精製、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換、アフィニティー、特にプロテインAなどの特定の抗原に対するアフィニティー、およびサイズ分画カラムクロマトグラフィー)、遠心、および示差溶解性が含まれる。組換えIgG抗体およびIgM抗体は当業者には既知の標準的な技術を用いて産生させることができる。

【００４０】

１つの実施形態においては、IgGおよびIgM抗体のソースとしての血漿が、ある動物に、その動物がC3b(i)または第2の分子と共有結合で結合させたC3b(i)に免疫特異的な抗体の投与を受けた日と同じ日に、癌、ウイルス感染、または微生物感染の治療または予防のために投与される。別の実施形態においては、IgGおよびIgM抗体のソースとしての血漿が、ある動物に、その動物がC3b(i)または第2の分子と共有結合で結合させたC3b(i)に免疫特異的な抗体の投与を受けた時点の数分から数時間(例えば、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間)前に、癌、ウイルス感染、または微生物感染の治療または予防のために投与される。

【００４１】

好ましい実施形態においては、IgGおよび/またはIgM抗体が、ある動物に、その動物がC3b(i)または第2の分子と共有結合で結合させたC3b(i)に免疫特異的な抗体の投与を受けた日と同じ日に、癌、ウイルス感染、または微生物感染の治療または予防のために投与される。別の好ましい実施形態においては、IgGおよび/またはIgM抗体が、ある動物に、その動物がC3b(i)または第2の分子と共有結合で結合させたC3b(i)に免疫特異的な抗体の投与を受けた時点の数分から数時間(例えば、5分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、または12時間)前に、癌、ウイルス感染、または微生物感染の治療または予防のために投与される。

【００４２】

5.2. 補体成分

好ましい実施形態においては、補体、特にC3のレベルが低いことが判明した動物には、正常血漿が、抗C3b(i)抗体の投与に先立って(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間前に)、それに引き続いて(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間後に)、またはそれと同時に、癌、ウイルス感染、または微生物感染の治療または予防のために投与される。この実施形態では、該血漿はその投与を受ける動物と同じ種から得たものである。別の実施形態においては、補体のレベルが低いことが判明した動物には、天然または組換えの補体タンパク質(例えば、C3)が、抗C3b(i)抗体の投与に先立って(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間前に)、それに引き続いて(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24

時間、2日、または1週間後に)、またはそれと同時に、癌、ウイルス感染、または微生物感染の治療または予防のために投与される。特別な実施形態においては、1種以上の補体成分が、ある動物が抗C3b(i)抗体の投与を受けた日と同じ日に、癌、ウイルス感染、または微生物感染の治療または予防のためにその同じ動物に投与される。別の実施形態においては、1種以上の補体成分が、ある動物が抗C3b(i)抗体の投与を受けた時点の数時間(例えば、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、または12時間)前に、癌、ウイルス感染、または微生物感染の治療または予防のためにその同じ動物に投与される。

【００４３】

補体成分、特に補体成分C3は市販のものを購入するか、または当業者には既知の標準的な精製技術を用いて精製することができる。標準的な精製技術の例としては、限定するものではないが、ゲルによる精製、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換、アフィニティー、特にプロテインAなどの特定の抗原に対するアフィニティー、およびサイズ分画カラムクロマトグラフィー)、遠心分離、および溶解度差が含まれる。組換え補体成分(例えば、C3)は当業者には既知の標準的な技術を用いて産生させることができる。本発明では、補体成分をコードする核酸配列は利用可能なデータベース、例えばGenBankから得ることができる。cDNAおよびゲノム配列の双方ともクローン化し発現させることができる。さらに、本発明では、癌、ウイルス感染、または微生物感染の治療または予防のためにある動物に投与される天然または組換え補体成分は、補体活性化の古典的経路および第二経路での機能を保持している。

【００４４】

補体成分、または機能的に活性な類縁体、またはそれらのその他の誘導体(例えばC3)をコードする塩基配列は、適切な発現ベクター、例えば、挿入されたタンパク質をコードする配列の転写および翻訳のために必要なエレメントを含んでいるベクター中に挿入することができる。例えば、Genbank 受け入れ番号 NM_000064およびK02765として開示されている、ヒトC3をコードする塩基配列を適切な発現ベクター中に挿入することができる。別の例としては、Genbank受け入れ番号NM_000063、NM_001734、J04080、およびAF019413としてそれぞれ開示されているヒトC1サブコンポーネント、ヒトC2またはヒトC2をコードする塩基配列を適切な発現ベクター中に挿入することができる。転写および翻訳に必要なシグナルは天然の補体成分遺伝子またはその隣接領域から供給することができる。該タンパク質をコードする配列の発現には様々な宿主-ベクター系を用いることができる。そのようなものとしては、限定するものではないが、ウイルス(例えば、ワクシニアウイルス、アデノウイルス)で感染させた哺乳類細胞系；ウイルス(例えば、バキュロウイルス)で感染させた昆虫細胞系；および酵母ベクターを含んでいる酵母またはバクテリオファージ、DNA、プラスミドDNA、もしくはコスミドDNAで形質転換させた細菌などの微生物が含まれる。ベクターの発現エレメントはその強度と特異性が様々である。用いた宿主-ベクター系の如何によって多数の適切な転写および翻訳エレメントのうちのいずれかを用いることができる。特別な実施形態においては、ヒト補体成分遺伝子またはヒト補体成分の機能的に活性な部分をコードする配列が発現される。

【００４５】

適切な転写および翻訳制御シグナルとタンパク質コード配列を含むキメラ遺伝子含有発現ベクターを構築するためには、当業者には既知のベクターへのDNA断片挿入のための方法のいずれを用いても良い。そのような方法としては、in vitro組換えDNAおよび合成技術、ならびにin vivo組換え体(遺伝子組換え)が挙げられる。補体成分またはその断片をコードする核酸配列の発現は、第2の核酸配列によって調節され、それにより該補体成分またはその断片が組換えDNA分子で形質転換された宿主細胞中に発現されるようにしてもよい。補体成分(例えばC3)の発現は、当業者に既知のどんなプロモーターエレメントまたはエンハンサーエレメントによって制御してもよい。とりわけ、補体成分の発現は、当業者には既知の構成的プロモーター、誘導可能なプロモーター、組織特異的プロモーター、または天然の補体成分プロモーターによって制御することができる。

【００４６】

補体成分(例えばC3)の発現を制御するために用いることのできるプロモーターとしては、限定するものではないが、SV40初期プロモーター領域(BernoistとChambon, 1981, Nature 290:304-310)などのウイルス性プロモーター、ラウス肉腫ウイルスの3'LTR中に含まれるプロモーター(Yamamotoら, 1980, Cell 22:787-797)、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター(Wagnerら, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441-1445)、β-ラクタマーゼプロモーターなどの原核生物のプロモーター(Villa-Kamaroffら, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3727-3731)、またはtacプロモーター(DeBoerら, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25)；また、「組換え細菌から得られる有用なタンパク質」"Useful proteins from recombinant bacteria", Scientific American, 1980, 242:74-94も参照されたい；ノパリンシンテターゼプロモーター領域(Herrera-Estrellaら, Nature 303:209-213)またはカリフラワーモザイクウイルス35S RNAプロモーター(Gardenerら, 1981, Nucl. Acids Res. 9:2871)などの植物プロモーター、光合成酵素であるリブロース二リン酸カルボキシラーゼのプロモーター(Herrera-Estrellaら, 1984, Nature 310:115-120)；Gal4プロモーター、ADC(アルコールデヒドロゲナーゼ)プロモーター、PGK(ホスホグリセロールキナーゼ)プロモーター、アルカリホスファターゼプロモーターなどの酵母またはその他の真菌から得たプロモーターエレメント；ならびに下記の動物転写制御領域で、それらは組織特異性を有しトランスジェニック動物中で用いられてきた：エラスターゼI遺伝子制御領域、これは膵臓腺房細胞中で活性であり(Swiftら, 1984, Cell 38:639-646; Ornitzら, 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515)、インスリン遺伝子制御領域、これは膵臓β細胞中で活性であり(Hanahan, 1985, Nature 315:115-122)、免疫グロブリン遺伝子制御領域、これはリンパ細胞中で活性であり(Grosschedlら, 1984, Cell 48:647-658; Adamesら, 1985, Nature 318:533-538；Alexanderら, 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444)、マウス乳腺腫瘍ウイルス制御領域、これは精巣、乳房、リンパ、および肥満細胞中で活性であり(Lederら, 1986, Cell 45:485-495)、アルブミン遺伝子制御領域、これは肝臓中で活性であり(Pinkertら, 1987, Genes adn Devel. 1:268-276)、 α-フェトプロテイン遺伝子制御領域、これは肝臓中で活性であり(Krumlaufら, 1985, Mol. Cell. biol. 5:1639-1648; Hammerら, 1987, Science 235:53-58)、α1-アンチトリプシン遺伝子制御領域、これは肝臓中で活性であり(Kelseyら, 1987, Genes and Devel. 1:161-171)、β-グロビン遺伝子制御領域、これは骨髄様細胞中で活性であり(Mogramら, 1985, Nature 315:338-340; Kolliasら, 1986, Cell 46:89-94)、ミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域、これは脳の希突起神経膠細胞中で活性であり(Readheadら,1987, Cell 48:703-712)、ミオシン軽鎖-2-遺伝子制御領域、これは骨格筋中で活性であり(Sani, 1985, Nature 314:283-286)、ならびにゴナドトロピン放出ホルモン遺伝子制御領域、これは視床下部で活性である(Masonら, 1986, Science 234:1372-1378)。特定の実施形態においては、該補体成分の発現を調節しているプロモーターは構成的プロモーターである。別の特定の実施形態においては、該補体成分の発現を調節しているプロモーターは誘導的、または組織特異的なプロモーターである。

【００４７】

特別な実施形態においては、補体成分を発現させるために用いるベクターは、補体成分(例えばC3)をコードする核酸に機能しうる形で連結したプロモーター、1つ以上の複製起点、および任意で、1つ以上の選択マーカー(例えば抗生物質耐性遺伝子)を含んでなる。

【００４８】

1種以上の補体成分をコードする塩基配列を含んでいる発現ベクターは3種類の一般的なアプローチで同定することができる：(a)核酸ハイブリダイゼーション；(b)「マーカー」遺伝子機能の存在または不在；および(c)挿入された配列の発現。第1のアプローチでは、ある発現ベクター中の補体成分(例えばC3)をコードする塩基配列の存在は、挿入された塩基配列に相同な配列を含んでなるプローブを用いた核酸ハイブリダイゼーションによって検出することができる。第2のアプローチでは、組換えベクター/宿主系は、ベクター中の補体成分をコードする塩基配列の挿入によって生ずる特定の「マーカー」遺伝子機能(例えば、チミジンキナーゼ活性、抗生物質に対する耐性、形質転換で現れる表現型、バキュロ

ウイルス中の封入体occlusion body 形成、その他)の存在または不在に基づいて同定および選択することができる。例えば、C3をコードするある塩基配列がベクターのマーカー遺伝子配列内に挿入された場合には、該塩基配列を含んでいる組換えベクターはマーカー遺伝子機能の不在によって同定することができる。第3のアプローチでは、組換え発現ベクターは該補体成分をコードする塩基配列によってコードされるRNAまたはポリペプチドをアッセイすることによって同定することができる。そのようなアッセイは、例えば、in vitroアッセイ系、例えばC3を抗C3抗体と結合させる系において補体成分の物理的または機能的性質に基づいて行うことができる。

【００４９】

宿主細胞は補体成分をコードする塩基配列、または補体成分をコードする塩基配列を含んでなるベクターで、例えば、マイクロインジェクション、電気穿孔法、リポフェクション、およびリン酸カルシウム沈澱などの当業者には既知の技術を用いてトランスフェクトすることができる。宿主細胞は安定的に、または一時的に、補体成分をコードする塩基配列、または補体成分をコードする塩基配列を含んでなるベクターを用いてトランスフェクトすることができる。

【００５０】

1種以上の組換え補体成分の長期にわたる、高収率の産生には、安定な発現が好ましい。例えば、1種以上の補体成分を安定に発現する細胞系統を作ることができる。ウイルス性の複製起点を含んでいる発現ベクターを用いるのではなく、宿主細胞は適切な発現制御エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位、その他)で制御されたDNA、および選択マーカーで形質転換することができる。外来DNAの導入後に、操作された細胞を、濃縮した培地中で1-2日間増殖させ、次いで選択的培地に転換することができる。組換えプラスミド中の選択マーカーは選択に対する抵抗性を与え、細胞がその染色体中へプラスミドを安定に組み込み、増殖して細胞巣を形成し、それが今度はクローン化されて細胞系統へと拡張されうることとなる。

【００５１】

多数の選択系を用いることができ、限定するものではないが、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(Wiglerら, 1977, Cell 11:223)、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(SzybalskaとSzybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026)、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowyら, 1980, Cell 22:817)遺伝子を含む系が、それぞれ、tk－、hgprt－、またはaprt－の細胞中で用いられる。また、代謝拮抗物質抵抗性も、選択の基礎として用いることができる：dhfr、これはメトトレキセートに対する抵抗性を与える(Wiglerら, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hareら, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527)；gpt、これはミコフェノール酸に対する抵抗性を与える(MulliganとBerg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072)；neo、これはアミノグリコシドG-418に対する抵抗性を与える(Golberre-Garapinら, 1981, J. Mol. Biol. 150:1)；およびhygro、これはハイグロマイシンに対する抵抗性を与える(Santerreら, 1984, Gene 30:147)、遺伝子である。

【００５２】

適切な宿主系と増殖条件が確立されれば、組換え発現ベクターは増殖させて多量を調整することができる。宿主細胞株は所望の特別な様式で挿入された配列の発現を変調するものを選ぶことができる。適切な細胞系統または宿主系は、発現される補体タンパク質に所望の改変とプロセッシングが行えるものを選択することができる。種々の宿主細胞は翻訳および翻訳後のタンパク質のプロセッシングと改変(例えば、糖鎖付加、およびリン酸化)のための特徴的で特異的なメカニズムを有している。例えば、細菌の系での発現は糖鎖の付加されていないコアタンパク質産物の産生に用いることができる。酵母で発現させると糖鎖が付加された産物が産生される。哺乳類宿主細胞中での発現は、異種タンパク質の「天然」の糖鎖付加された形のものを得るために用いることができる。そのような哺乳類細胞としては、限定するものではないが、293T、CHO、VERY、BHK、Hela、COS、MDCK、293、3T3、MT2、U937、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20、T47D、CRL7030、Hs578Bst、リンパ球

および線維芽細胞が含まれる。さらに、種々のベクター/宿主発現系で種々の程度にプロセッシング反応を起こさせることができる。

【００５３】

5.3. 抗体

本発明の抗体としては、限定するものではないが、ポリクローナル、モノクローナル、二重特異性、ヒト、ヒト化もしくはキメラ抗体、単鎖抗体、sFvs、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、Fab発現ライブラリーの発現によって産生されるフラグメント、抗イディオタイプ抗体(抗Id)、および癌細胞抗原、ウイルス抗原、微生物抗原、C3b(i)、もしくはそれらの断片、または第2の分子に連結されたC3b(i)に免疫特異的に結合する上記のいずれかのエピトープ結合性フラグメントが含まれる。本明細書で用いている「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、癌細胞抗原、ウイルス抗原、微生物抗原、C3b(i)、または第2の分子に連結(例えば、共有結合で)されたC3b(i)に免疫特異的に結合する抗原結合部位を含んでいる分子を意味している。本発明の免疫グロブリン分子は、どんなタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、およびIgA)、クラス、またはサブクラスの免疫グロブリン分子であってもよい。

【００５４】

本発明の方法で用いることのできるポリクローナル抗体は、免疫された動物の血清由来の抗体分子の異種の集団である。対象とする抗原に対するポリクローナル抗体の作製には当該分野ではよく知られた種々の方法を用いることができる。例えば、ポリクローナル抗体の作製には、対象とする抗原またはその誘導体を注射することによって種々の宿主動物を免疫することができ、そのような動物としては、限定するものではないが、ウサギ、マウス、ラット等が含まれる。免疫応答を増大させるために種々のアジュバントを用いることができ、そのようなものとしては、限定するものではないが、フロイント(完全および不完全)アジュバント、水酸化アルミニウムなどの無機質ゲル、リゾレシチンなどの界面活性物質、プルロニックポリオール、多価陰イオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、ならびにBCG(Bacille Calmette-Guerin)およびcorynebacterium parvumなどの潜在的有用性を有するヒトアジュバントが含まれる。そのようなアジュバントは当該分野ではよく知られている。

【００５５】

本発明の方法で用いることのできるモノクローナル抗体はある特定の抗原(例えば、癌細胞抗原、ウイルス抗原、微生物抗原、C3b(i)または第2の分子と共有結合で連結させたC3b(i)など)に対する抗体の均一な集団である。対象とする抗原に対するモノクローナル抗体(mAb)は、培養液中での連続的な細胞株による抗体分子の産生を提供する、当該分野で既知のいかなる技術によって調製してもよい。そのような技術としては、限定するものではないが、KohlerとMilstein(1975, Nature 256, 495-497)によって最初に報告されたハイブリドーマ技術、より最近報告されたヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborら, 1983, Immunology Today 4:72)、およびEBV-ハイブリドーマ技術(Coleら, 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96)が含まれる。そのような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、およびIgDを含む免疫グロブリンのどのクラスのものでもまた、それらのサブクラスのいずれでも良い。本発明で用いるmAbを産生するハイブリドーマはin vitroまたはin vivoで培養することができる。

【００５６】

本発明で用いるモノクローナル抗体としては、限定するものではないが、ヒトモノクローナル抗体、またはキメラヒト-マウス(またはその他の種)モノクローナル抗体が含まれる。ヒトモノクローナル抗体は当該分野で既知の多数の技術のいずれを用いて作製してもよい(例えば、Tengら, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 7308-7312; Kozborら, 1983, Immunology Today 4:72-79; およびOlssonら, 1982, Meth. Enzymol. 92, 3-16)。

【００５７】

本発明はさらに、二重特異的抗体の使用を提供する。二重特異的抗体の作製方法は当該分野では既知である。完全長の二重特異的抗体の伝統的な作製法は2つの免疫グロブリン重

鎖-軽鎖ペアの同時発現に基づくものであり、その2本の鎖は異なる特異性を有している(Milsteinら，1983，Nature 305:537-539)。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖のランダムな集まりが起こるので、これらのハイブリドーマ(quadroma)は10種類の異なる抗体分子の混合物となる可能性があり、そのうちの1種のみが正しい二重特異性構造を有している。その正しい分子の精製は通常はアフィニティークロマトグラフィーで行われるが、それはかなりやっかいであり、産物の収率も低い。

【００５８】

同様な方法が、PCT公開No. WO 93/08829，1993年5月13日付に開示されており、また、Traunecker ら，1991，EMBO J. 10:3655-3659に報告されている。

【００５９】

別の、より好ましいアプローチでは、所望の結合特異性を有する抗体可変領域(抗体-抗原結合部位)を免疫グロブリン定常領域配列に融合させる。この融合体は好ましくは、ヒンジ部の少なくとも一部、CH2、およびCH3領域を含んでいる免疫グロブリン重鎖定常ドメインを有している。軽鎖を結合するために必要な部位を含んでいる第1重鎖定常領域(CH1)が融合体の少なくとも1つに存在していることが好ましい。それらの免疫グロブリン重鎖融合体、および所望により免疫グロブリン軽鎖をコードする、複数のDNAは別々の発現ベクター中に挿入され、適切な宿主生物体中に同時トランスフェクトされる。このことによって、該構築物中に用いられる3種のポリペプチド鎖の比が等しくないことが最適な収率をもたらす場合には、3種のポリペプチドの相対比の調整は非常に柔軟なものとなる。しかし、少なくとも2つのポリペプチド鎖を等しい比率で発現させることが高収率をもたらすような場合、または比率が特別な意味を持たない場合には、ポリペプチド鎖の2つまたは3つ全てのコード配列を1つの発現ベクター中に挿入することが可能である。

【００６０】

このアプローチの好ましい実施形態においては、該二重特異的抗体は、第1の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖を１つのアームに持ち、ハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖のペア(第2の結合特異性を有している)を別のアームに持っている。免疫グロブリン軽鎖がこの二重特異的分子の一方のアームにのみ存在すると分離が容易になるので、この非対称構造は、所望の二重特異的化合物を望ましくない免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にする。このアプローチはPCT公開No，WO94/04690，1994年3月3日付中に開示されており、本明細書中にその全体を参照として組み入れるものとする。

【００６１】

二重特異的抗体を作製のさらに詳細な事項については、例えば、Sureshら，Methods in Enzymology，1986，121:210を参照されたい。このような技術を用いれば、抗C3b(i)抗体とエフェクター細胞のレセプターまたは抗原に特異的な抗体は、本明細書で定義する疾患の治療と防止に用いるために作製することができる。

【００６２】

本発明は、癌細胞抗原、ウイルス抗原、および微生物抗原に免疫特異的に結合する抗体の機能的に活性なフラグメント、誘導体、もしくは類縁体の使用を提供する。機能的に活性とは、該フラグメント、誘導体、または類縁体が、それらのもととなった抗体が認識する抗原と同じ抗原を認識する抗イディオタイプ抗体を引き出すことのできるフラグメント、誘導体、または類縁体であることを意味している。具体的にいえば、好ましい実施形態においては、該免疫グロブリン分子のイディオタイプの抗原性は、その抗原を特異的に認識するCDR配列のC末端であるフレームワークおよびCDR配列を欠失させることによって増強することができる。どのCDR配列が抗原と結合するのかを決めるために、当該分野で既知のどのような結合アッセイ法(例えば、BIAコアアッセイ)により、該CDR配列を含む合成ペプチドを抗原を用いた結合アッセイで使用することができる。

【００６３】

本発明の他の実施形態には、本発明の抗体のフラグメント、例えば、限定するものではないが、$F(ab')_2$フラグメント（可変領域、軽鎖定常領域、および重鎖のCH1ドメインを含む

もので、抗体分子のペプシン消化で作製することができる）、およびFabフラグメント（F(ab')$_2$フラグメントのジスルフィド結合を還元することによって作製することができる）が含まれる。本発明はまた、本発明の抗体の重鎖と軽鎖2量体、またはFvもしくは単鎖抗体(SCA)などのそれらの任意の極小フラグメント(例えば、米国特許第4,946,778号; Bird, 1988, Science 242:423-42; Hustonら, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; およびWardら, 1989, Nature 334:544-54)、あるいは本発明の抗体と同一の特異性を有するその他の全ての分子をも提供する。

【００６４】

さらに、標準的な組換えDNA技術で作製できる、ヒト由来の部分とヒト以外の動物由来の部分を含んでなる、例えばキメラおよびヒト化モノクローナル抗体などの組換え抗体は本発明の範囲に含まれる。キメラ抗体は別々の動物種由来の別々の部分を有している分子であり、例えばマウスモノクローナル抗体由来の可変領域とヒモ免疫グロブリン定常領域を有する分子などである。(例えば、Cabillyら, 米国特許第4,816,567号; およびBossら, 米国特許第4,816,397号を参照すればよく、本明細書中にその全体を参照として組み入れるものとする)。ヒト化抗体は、ヒト以外の動物種からの1つ以上の相補性決定領域(CDR)とヒト免疫グロブリン分子からのフレームワーク領域とを有する、ヒト以外の動物種の抗体分子である。(例えば、Queen, 米国特許第5,585,089号を参照すればよく、本明細書中にその全体を参照として組み入れる)。そのようなキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は当該分野で既知の組換えDNA技術によって作製することができ、例えば、PCT公開No.WO 87/02671; 欧州特許出願 184,187号; 欧州特許出願 171,496号; 欧州特許出願 173,494号; PCT公開No. WO 86/01533; 米国特許第4,816,567号; 欧州特許出願 125,023号; Betterら, 1988, Science 240:1041-1043; Luiら, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liuら, 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sunら, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimuraら, 1987, Canc. Res. 47:999^1005; Woodら, 1985, Nature 314:446-449; およびShawら, 1988, J. Natul. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, 1985, Science 229:1202-1207; Oiら, 1986, Bio/Techniques 4:214; 米国特許第5,225,539号; Jonesら, 1986, Nature 321:552-525; Verhoeyanら, 1988, Science 239:1534; およびBeidlerら, 1988, J. Immunol. 141:4053-4060;を参照することができ、本明細書中にそれらの全体を参照として組み入れる。

【００６５】

完全にヒト型の抗体がヒト患者の治療には特に望ましい。そのような抗体は内因性の免疫グロブリン重鎖および軽鎖の遺伝子を発現することができないが、ヒトの重鎖および軽鎖の遺伝子を発現することのできるトランスジェニックマウスを用いて作製することができる。該トランスジェニックマウスは選択した抗原、例えば、本発明のポリペプチドの全体または部分を用いて通常のやり方で免疫される。該抗原に対するモノクローナル抗体は従来のハイブリドーマ技術を用いて得ることができる。該トランスジェニックマウスによって保持されているヒト免疫グロブリントランスジーンは、B細胞の分化の間に再構成され、次いでクラススイッチおよび体細胞変異を受ける。従って、このような技術を用いれば、治療上有用なIgG、IgA、IgM、およびIgE抗体の産生が可能である。ヒト抗体を作製するこの技術の概説としては、LonbergとHuszar(1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93)を参照されたい。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を作製するためのこの技術と、このような抗体を作製するためのプロトコールの詳細については、例えば、米国特許第5,625,126号; 米国特許第5,633,425号; 米国特許第5,569,825号; 米国特許第5,661,016号; および米国特許第5,545,806号を参照すればよく、本明細書中にその全体を参照として組み入れる。さらに、Abgenix, Inc.(Freemont, CA)およびGenpharm(San Jose, CA)などの企業は上述と同様の技術を用いて、ある選択された抗原に対するヒト抗体を依頼に応じて提供することができる。

【００６６】

選択したエピトープを認識する、完全にヒト型の抗体は、「guided selection」と呼ばれる技術を用いて作製することができる。このアプローチでは選択したヒト以外の動物のモ

ノクローナル抗体、例えばマウス抗体が、同じエピトープを認識する、完全ヒト型抗体の選択をガイドするために用いられる。(Jespersら, 1994, Bio/technology 12:899-903)。

【００６７】

別の実施形態では、本発明は、本発明の抗体(またはその機能的に活性なフラグメント)の融合タンパク質提供し、例えば、その融合タンパク質では抗体は共有結合(例えばペプチド結合)を介して抗体ではない別のタンパク質(またはその部分、好ましくはそのタンパク質のアミノ酸の個数で少なくとも10、20、または50個の部分)のアミノ酸配列のN末端またはC末端のいずれかで連結される。好ましくは、該抗体またはそのフラグメントは別のタンパク質と、定常ドメインのN末端で共有結合により連結される。

【００６８】

本発明の抗体には、改変された、すなわち、他の分子と共有結合により連結されることによって修飾された類縁体および誘導体が含まれ、該他の分子はその共有結合による連結が抗体の抗イディオタイプ性の応答を妨害しないようなものである限りはいかなるタイプのものであってもよい。例えば、限定するものではないが、該抗体の誘導体および類縁体としては、糖鎖付加、アセチル化、PEG化、リン酸化、アミド化、既知の保護基/ブロッキング基による誘導体化、タンパク分解酵素による切断、細胞性リガンドまたは他のタンパク質との連結等によってさらに修飾されたものが含まれる。任意の非常に多数の化学修飾が既知の技術によって行うことができ、そのようなものとしては、限定するものではないが、特異的化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成等が含まれる。さらに、該類縁体または誘導体は1個以上の非古典的アミノ酸を含有することができる。

【００６９】

本発明の抗体には、Fcレセプターと相互作用するアミノ酸残基に修飾(例えば、置換、欠失、または付加)のある抗体が含まれる。とりわけ、本発明の抗体には、FcドメインとFcRnレセプター間の相互作用に関与しているとして同定されているアミノ酸残基に修飾のある抗体が含まれる(例えば、PCT公開No. WO97/34631を参照すればよく、本明細書中にその全体を参照として組み入れる)。

【００７０】

5.3.1. 抗C3b(i)抗体

特別な実施形態においては、抗C3b(i)抗体はC3b(i)またはその断片(C3b(i)のアミノ酸残基の少なくとも5個、少なくとも10個、少なくとも15個、少なくとも25個、またはそれ以上のC3b(i)の隣接したアミノ酸残基を有する)に免疫特異的である。別の実施形態においては、抗C3b(i)抗体は第2の分子に共有結合で連結させたC3b(i)に免疫特異的である。好ましい実施形態においては、抗C3b(i)抗体はモノクローナル抗体またはFabフラグメントである。別の好ましい実施形態においては、抗C3b(i)抗体はIgGまたはIgM抗体に結合したC3b(i)に免疫特異的であり、該C3b(i)抗体は配置または溶媒中のC3b(i)との交差反応性は非常に小さい。別の好ましい実施形態においては、抗C3b(i)抗体は癌細胞に結合したC3b(i)、またはウイルスもしくは微生物に結合したC3b(i)に免疫特異的であり、該抗C3b(i)抗体は培地もしくは環境中のC3b(i)との交差反応性は非常に小さい。また別の好ましい実施形態においては、ヒトに投与される抗C3b(i)抗体はヒト化またはヒトモノクローナル抗体である。

【００７１】

抗C3b(i)抗体は任意の機関(例えば、大学の科学者もしくはResearch Diagnostics Inc., New Jerseyなどの企業)から入手することができ、または当業者に既知の任意の方法で作製することができる。例えば、抗C3b(i)抗体は化学合成または組換え発現技術で作製することができる。抗C3b(i)抗体をコードする塩基配列は、例えば、GenBankデータベースもしくはそれに類似のデータベース、公表文献から、または日常的に行われているクローニングおよび配列分析によって入手することができる。

【００７２】

１つの実施形態においては、抗C3b(i)抗体はモノクローナル抗体7C12、2H11、8E11、また

は3E7である(例えば、Fargusonら，1995，Arthritis Rheum. 38:190; Taylorら，1989，J. Immunology 143:3626; Tosicら，1989，J. Immunol. Methods 120:241; およびSokoloffら，2000，Cancer Immunol. Immunother. 49:551-562を参照すればよく、本明細書中にその全体を参照として組み入れる)。別の実施形態においては、抗C3b(i)抗体は、例えばELISAなどのイムノアッセイで測定するとき、C3b(i)もしくはその断片への結合について7C12、2H11、8E11、または3E7と競合する抗体である。好ましい実施形態においては、抗C3b(i)抗体はモノクローナル抗体3E7である。別の好ましい実施形態においては、抗C3b(i)抗体は、例えばELISAなどのイムノアッセイで測定するとき、C3b(i)もしくはその断片への結合についてモノクローナル3E7と競合する抗体である。また別の好ましい実施形態においては、抗C3b(i)抗体は、モノクローナル抗体3E7およびモノクローナル抗体7G9を含んでなる二重特異性モノクローナル抗体である(例えば、Sokoloffら，2000，Cancer Immunol. Immunother. 49:551-562を参照されたい)。

【００７３】

5.3.2. 癌細胞に免疫特異的な抗体

特定の実施形態においては、本発明の方法で使用するための癌細胞抗原に免疫特異的な抗体は、モノクローナル抗体またはFabフラグメントである。好ましくは、ヒトに投与される、癌細胞抗原に免疫特異的な抗体はヒト化抗体、またはヒトモノクローナル抗体である。本明細書では、「癌細胞抗原」という用語は、癌細胞上で、癌ではない細胞、好ましくは正常細胞と比べ、優先的にまたは区別しうる形で発現している抗原(例えば、タンパク質、糖タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、もしくは糖脂質)を意味する。癌細胞抗原の例としては、限定するものではないが、不適切に糖鎖付加されたタンパク質および脂質、CD20、Her-2、およびPSMAが含まれる。

【００７４】

癌細胞抗原に免疫特異的な抗体は、任意の機関(例えば、大学の科学者もしくはGenentechなどの企業)から入手することができ、または当業者には既知の任意の方法、例えば、化学合成または組換え発現技術で作製することができる。癌細胞抗原に免疫特異的な抗体をコードする塩基配列は、例えば、GenBankデータベースもしくはそれに類似のデータベース、公表文献から、または日常的に行われているクローニングおよび配列分析によって入手することができる。

【００７５】

特別な実施形態においては、癌に対する治療または予防のための既知の抗体を本発明の方法で用いることができる。癌の治療に利用可能な抗体の例としては、限定するものではないが、Herceptin(登録商標)(Trastuzumab; Genentech, CA)、これは転移性乳癌患者の治療のためのヒト化抗HER-2モノクローナル抗体である；Retuxan(登録商標)(rituximab; Genentech)、これは非ホジキンリンパ腫患者の治療のためのキメラ抗CD20モノクローナル抗体である；OvaRex(AltaRex Corporation, MA)、これは卵巣癌治療のためのマウス抗体である；Panorex(Glaxo Wellcome, NC)、これは大腸直腸癌の治療のためのマウス$IgG_{2a}$抗体である；BEC2(ImClone Systems Inc., NY)、これは肺癌治療のためのマウスIgG抗体である；IMC-C225(ImClone Systems Inc., NY)、これは頭頚部癌の治療のためのキメラIgG抗体である；Vitaxin(MedImmune, Inc., MD)、これは肉腫の治療用のヒト化抗体である；Campath I/H(Leukosite, MA)、これは慢性リンパ性白血病(CLL)の治療のためのヒト化$IgG_1$抗体である；Smart MI95(Protein Design Labs, Inc., CA)、これは急性骨髄性白血病(AML)の治療のためのヒト化IgG抗体である；LymphoCide(Immunomedics, Inc., NJ)、これは非ホジキンリンパ腫の治療のためのヒト化IgG抗体である；Smart ID10(Protein Design Labs, Inc., CA)、これは非ホジキンリンパ腫の治療のためのヒト化抗体である；ならびにOncolyn(Techniclone, Inc., CA)、これは非ホジキンリンパ腫の治療のためのマウス抗体である。

【００７６】

5.3.3. ウイルスおよび微生物抗原に対する抗体

特別な実施形態においては、特定の実施形態においては、本発明の方法で使用するための

ウイルス抗原または微生物抗原に免疫特異的な抗体は、モノクローナル抗体である。好ましくは、ヒトに投与される、ウイルス抗原または微生物抗原に免疫特異的な抗体はヒト化抗体、またはヒトモノクローナル抗体である。本明細書では、「ウイルス抗原」という用語は、限定するものではないが、免疫応答を引き出すことのできる、ウイルスペプチド、ポリペプチド、タンパク質(例えば、HIV gp120、HIV nef、RSV F糖タンパク質、インフルエンザウイルスノイラミニダーゼ、インフルエンザウイルスヘマグルチニン、HTLV tax、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質(例えば、gB、gC、gD、およびgE)、ならびにB型肝炎ウイルス表面抗原)の全てを意味する。本明細書では、「微生物抗原」という用語は、限定するものではないが、免疫応答を引き出すことのできる、微生物ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、糖、多糖、または脂質分子(例えば、細菌性、真菌性、病原性の原生動物、または、例えばLPSおよび莢膜多糖5/8などを含む酵母ポリペプチド)の全てを意味する。

【００７７】

ウイルス抗原または微生物抗原に免疫特異的な抗体は、任意の機関(例えば、大学の科学者もしくはGenentechなどの企業)から入手することができ、または当業者に既知の任意の方法、例えば、化学合成または組換え発現技術で作製することができる。ウイルス抗原または微生物抗原に免疫特異的な抗体をコードする塩基配列は、例えば、GenBankデータベースもしくはそれに類似のデータベース、公表文献から、または日常的に行われているクローニングおよび配列分析によって入手することができる。

【００７８】

特別な実施形態においては、ウイルス感染または微生物感染に対する治療または予防のための既知の抗体を本発明の方法で用いることができる。ウイルス感染または微生物感染の治療に利用可能な抗体の例としては、限定するものではないが、Synagis(登録商標)(MedImmune, Inc., MD)、これはRSウイルス(RSV)感染患者の治療のためのヒト抗RSVモノクローナル抗体である；PRO542(Progenics)、これはHIV感染の治療のためのCD4融合抗体である；Ostavir(Protein Design Labs, Inc., CA)、これはB型肝炎ウイルス感染治療のためのヒト抗体である；Protovir(Protein Design Labs, Inc.,CA)、これはサイトメガロウイルス(CMV)の治療のためのヒト化$IgG_1$抗体である；および抗LPS抗体が含まれる。

【００７９】

5.4. 組換え抗体の作製

本発明の抗体は、抗体の合成法として当該分野では既知の任意の方法、特に化学合成または組換え発現によって作製することができ、好ましくは、組換え発現技術によって作製される。

【００８０】

本発明の抗体、またはそのフラグメント、誘導体、もしくは類縁体の組換え発現には、その抗体をコードする核酸の構築を必要とする。その抗体の塩基配列が既知の場合には、その抗体をコードする核酸は化学合成されたオリゴヌクレオチドからアセンブルすることができ(例えば、Kutmeierら, 1994, BioTechniques 17:242に報告されているように)、簡潔に述べれば、それには、該抗体をコードする配列の部分を含んでいる、オーバーラップするオリゴヌクレオチドの合成、それらのオリゴヌクレオチドのアニーリングおよびライゲーション、ならびにその後のライゲートされたオリゴヌクレオチドのPCRによる増幅が含まれる。

【００８１】

あるいはまた、抗体をコードする核酸分子は適切なソースから作製することができる。ある特定の抗体をコードする核酸を含んでいるクローンが利用できないがその抗体の配列が既知である場合には、該抗体をコードする核酸は適切なソース(例えば、抗体cDNAライブラリー、またはその免疫グロブリンを発現している任意の組織または細胞から作製したcDNAライブラリー)から、その配列の3'および5'末端とハイブリダイズしうる合成プライマーを用いたPCR増幅、またはその特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いたクローニングによって得ることができる。

【００８２】
ある特定の抗原を特異的に認識する抗体が利用できない(またはそのような免疫グロブリンをコードする核酸のクローニングのためのcDNAライブラリーのためのソースが利用できない)場合には、ある特定の抗原に対して特異的な抗体は、当該分野で既知の任意の方法、例えばウサギなどの動物を免疫してポリクローナル抗体を作製するか、より好ましくは、例えば、KozborとMilstein(1975, Nature 256:495-497)の報告にしたがい、またはKozborら(983, Immunology Today 4:72)もしくはColeら(1985, 「モノクローナル抗体と癌治療」"Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Aln R. Liss, Inc., pp77-96)の報告にしたがって、モノクローナル抗体を作製することにより、作製することができる。あるいはまた、該抗体の少なくともFab部分をコードするクローンはFab発現ライブラリーを特定の抗原と結合するFabフラグメントのクローンについてスクリーニングすること(例えば、Huseら, 1989, Science 246:1275-1281で報告されているように)、または抗体ライブラリーをスクリーニングすること(例えば、Clarksonら, 1991, Nature 352:624; Haneら, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937)によって得ることができる。

【００８３】
該抗体の少なくとも可変ドメインをコードする核酸配列が得られれば、それをその抗体の定常領域をコードする塩基配列を含んでいるベクター中に導入することができる(例えば、PCT公開No. WO 86/05807; PCT公開No. WO 89/01036; および米国特許第5,122,464号を参照されたい)。完全な抗体分子を発現することのできる、完全な軽鎖または重鎖を含んでいるベクターが入手可能である。さらに、該抗体をコードする核酸を、鎖間のジスルフィド結合に参加している可変領域システイン残基の1個以上をスルフヒドリル基を含んでいないアミノ酸残基と置換(または欠失)させるために必要な塩基の置換または欠失を導入するために用いることができる。そのような修飾は特別な変異または欠失を塩基配列中に導入する方法として当該分野では既知の任意の方法によって行うことができ、そのような方法としては、限定するものではないが、化学的突然変異導入法およびin vitro部位特異的突然変異導入法が含まれる(Hutchinsonら, 1978, J. Biol. Chem. 253:6551)。

【００８４】
さらに、適切な抗原特異性を有するマウス抗体分子由来の遺伝子を適切な生物活性を有するヒト抗体分子由来の遺伝子とともにスプライシングすることによって、「キメラ抗体」を作製するために開発された技術(Morrisonら, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neubergerら, 1984, Nature 312:604-608; Takadaら, 1985, Nature 314:452-454)を用いることができる。上述のとおり、キメラ抗体とは別々の動物種に由来する別々の部分を有している分子で、例えば、マウスモノクローナル抗体由来の可変領域とヒト免疫グロブリン定常領域とを有している分子で、例えばヒト化抗体である。

【００８５】
あるいはまた、単鎖抗体の作製のためのものとして報告された技術(米国特許第4,694,778号; Bird, 1988, Science 242:423-42; Houstonら, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; およびWardら, 1989, Nature 334:544-54)を単鎖抗体の作製に適応させることができる。単鎖抗体は重鎖および軽鎖のFv領域のフラグメントをアミノ酸の架橋を介して連結することによって形成され、単鎖のポリペプチドがもたらされる。大腸菌(E.coli)を利用した機能的Fvフラグメントのアセンブリーのための技術を用いることができる(Skerraら, 1988, Science 242:1038-1041)。

【００８６】
特定のエピトープを認識する抗体フラグメントは既知の技術によって作製することができる。例えば、そのようなフラグメントとしては、限定するものではないが：抗体分子のペプシン消化で作製することができる$F(ab')_2$フラグメント、および$F(ab')_2$フラグメントのジスルフィド結合を還元することによって作製することができるFabフラグメントが含まれる。

【００８７】
本発明の抗体をコードする核酸配列が得られれば、その抗体を産生させるためのベクター

を当該分野ではよく知られた技術を用いて組換えDNA技術によって作製することができる。抗体コード配列および適切な転写および翻訳制御シグナルを含む発現ベクターを構築するために、当業者に周知の方法を用いることができる。そのような方法としては、例えば、in vitro組換えDNA技術、合成技術、およびin vivo遺伝子組換え法が含まれる。例えば、Sambrookら(1990, 「分子クローニング、実験室マニュアル」"Molecular Cloning, A Laboratory Manual"第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY、およびAusubelら(編、1998, 「分子生物学の今日のプロトコール」"Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, NY)を参照されたい。

【００８８】

抗体の塩基配列を含んでいる発現ベクター、または抗体の塩基配列は宿主細胞中へ従来の技術によって移送することができ(例えば、電気穿孔法、リポゾームトランスフェクション、およびリン酸カルシウム沈澱など)、そのトランスフェクトされた細胞を従来の技術により培養し、本発明の抗体を産生させる。特別な実施形態においては、該抗体の発現は、構成的、誘導性、または組織特異的プロモーターによって調節される。

【００８９】

本発明の組換え抗体の発現のために用いられる宿主細胞は、大腸菌(E.coli)などの細菌細胞、あるいは、好ましくは、特に組換え免疫グロブリン分子の全体を発現させるためには任意の真核細胞である。とりわけ、ヒトサイトメガロウイルスから得た主要中間初期遺伝子プロモーターエレメントなどのベクターとコンジュゲートした、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)などの哺乳類細胞は、免疫グロブリンの効果的発現系である(Foeckingら, 1998, Gene 45:101; Cockettら, 1990 Bio/Technology 8.2)。

【００９０】

本発明の免疫グロブリン分子の発現には種々の宿主-発現ベクター系を用いることができる。そのような宿主-発現ベクター系とは、抗体のコード配列を作製し、次いで精製するための手段を意味するが、適切な塩基配列を用いて形質転換またはトランスフェクトされた場合に本発明の免疫グロブリン分子をin situで発現することのできる細胞をも意味する。そのような系としては、限定するものではないが、免疫グロブリンコード配列を含んでいる組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、またはコスミドDNAの発現ベクターを用いて形質転換された細菌(例えば、大腸菌(E.coli)および枯草菌(B.subtilis))などの微生物；免疫グロブリンコード配列を含んでいる組換え酵母発現ベクターを用いて形質転換された酵母(例えば、Saccharomyces Pichia)；免疫グロブリンコード配列を含んでいる組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)を用いて感染させた昆虫細胞系；免疫グロブリンコード配列を含んでいる組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)およびタバコモザイクウイルス(TMV))を用いて感染させた、または組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)を用いて形質転換させた植物細胞系；または、哺乳類細胞のゲノム由来のプロモーター(例えば、メタロチオネインプロモーター)もしくは哺乳類のウイルス由来のプロモーター(例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター)を含んでいる組換え発現構築物を有している哺乳類細胞系(例えば、COS、CHO、293、293T、3T3細胞)が含まれる。

【００９１】

細菌の系では、発現しようとする抗体により多数の発現ベクターから有利なものを選択することができる。例えば、そのようなタンパク質を多量に産生させる場合、抗体医薬組成物の作製のためには、精製容易な融合タンパク質産物を高レベルで発現しうるベクターが望ましい。そのようなベクターとしては、限定するものではないが、大腸菌(E.coli)発現ベクターpUR278(Rutherら, 1983, EMBO J. 2:1791)、このベクター中では抗体コード配列が個々にlacZコード領域と同一フレームでベクター中に連結されて融合タンパク質が産生されるものである；pINベクター(InouyeとInouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van HeekeとScuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509)；等が含まれる。pGEXベクターも外来ポリペプチドをグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として発現させるために用いることができる。一般的には、そのような融合タンパク

質は可溶性であり、融解させた細胞からマトリクスグルタチオン-アガロースビーズに吸着および結合させ、遊離のグルタチオンの存在下で溶出させることによって、容易に精製することができる。pGEXベクターはトロンビンまたは第Xa因子プロテアーゼ切断部位が含まれるようにデザインされているので、クローン化された標的の遺伝子産物をGST部分から放出させることができる。

【００９２】

昆虫の系では、Autographa californica核多角体病ウイルス(AcNPV)が外来遺伝子発現のためのベクターとして用いられる。このウイルスはSpodoptera frugiperda細胞中で増殖する。抗体コード配列はこのウイルスの非必須領域(例えば、ポリヘドリン遺伝子)中に個々にクローン化することができ、AcNPVプロモーター(例えば、ポリヘドリンプロモーター)の制御下に置かれる。

【００９３】

哺乳類宿主細胞では、ウイルスをベースとした多数の発現系を用いることができる。発現ベクターとしてアデノウイルスが用いられる場合には、対象の抗体コード配列はアデノウイルス転写/翻訳制御複合体、例えば後期プロモーターおよび３部からなる（tripartite）リーダー配列に連結することができる。次いでこのキメラ遺伝子を、in vitroまたはin vivo組換えによりアデノウイルスのゲノム中に挿入することができる。ウイルスゲノムの非必須領域(例えば、領域E1またはE3)中への挿入は、感染させた宿主中で生存して免疫グロブリン分子の発現を行うことのできる組換えウイルスをもたらす。(例えば、LoganとShenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359を参照されたい)。挿入された抗体コード配列の効率的な翻訳には特別な開始シグナルも必要であろう。これらのシグナルとしては、ATG開始コドンおよび近接の配列を含んでいる。さらに、その開始コドンは、そのインサート全体の翻訳を確実に行うために所望のコード配列のリーディングフレームとともに適切な位置になければならない。これらの外因性の制御シグナルおよび開始コドンは天然および合成の様々な起源のものとすることができる。発現の効率は適切な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーター、その他を含ませることによって増大させることができる。(Bittnerら, 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544)。

【００９４】

さらに、宿主細胞株は、挿入された配列の発現を修飾するか、または遺伝子産物を所望の特別な様式で改変しプロセスするものを選択することができる。そのようなタンパク質産物の改変(例えば、糖鎖付加)およびプロセシング(例えば、切断)はそのタンパク質の機能に重要なものとなる可能性がある。種々の宿主細胞が、翻訳後プロセシングとタンパク質産物と遺伝子産物の改変のための特徴的で特異的なメカニズムを有している。発現される外来タンパク質の正しい改変とプロセシングを確実に行うために適切な細胞系統または宿主系を選択することができる。その目的のために、一次転写物の正しいプロセシング、糖鎖付加、および遺伝子産物のリン酸化のための細胞内装置を有している真核生物の宿主細胞を用いることができる。そのような哺乳類宿主細胞としては、限定するものではないが、CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、293T、3T3、WI38、BT483、Hs578T、HTB2、BT20、およびT47D、CRL7030、ならびにHs578Bstが含まれる。

【００９５】

組換えタンパク質の長期にわたる高収率の産生には、安定な発現が好ましい。例えば、抗体を安定に発現する細胞系統を作り出すことができる。ウイルスの複製起点を含んでいる発現ベクターを用いるよりも、適切な発現制御エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位等)によって制御されているDNA、および選択マーカーを用いて宿主細胞を形質転換するほうがよい。外来遺伝子の導入後、操作された細胞は栄養培地中で1-2日間増殖させ、その後選択培地に写せばよい。組換えプラスミド中の選択マーカーは選択に対する抵抗性を付与し、細胞がそのプラスミドを細胞の染色体中に安定に組み入れることができるようにし、増殖してフォーカスを形成し、それが今度はクローン化され拡大されて細胞系統となる。この方法は該抗体を発現している細胞系統を操作することに用いると有利であろう。そのような操作された細胞系統

は、その抗体と直接的または間接的に相互作用する化合物のスクリーニングと評価に特に有用である。

【００９６】

多数の選択系を用いることができ、それらとしては、限定するものではないが、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(Wiglerら, 1977, Cell 11:223)、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(SzybalskaとSzybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026)、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowyら, 1980, Cell 22:817)遺伝子を、それぞれ、tk－、hgprt－、またはaprt－の細胞中で用いることができる。また、代謝拮抗物質抵抗性も、次の遺伝子の選択に用いることができる：dhfr、これはメトトレキセートに対する抵抗性を与える(Wiglerら, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hareら, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527)；gpt、これはミコフェノール酸に対する抵抗性を与える(MulliganとBerg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072)；neo、これはアミノグリコシドG-418に対する抵抗性を与える(Clinical Pharmacy 12:488-505; Wuと Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; およびMorganとAnderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIB TECH 11(5):155-215);およびhygro、これはヒグロマイシンに対する抵抗性を与える(Santerreら, 1984, Gene 30:147)、遺伝子である。

【００９７】

ここで用いうる、組換えDNA技術の業界で一般的に知られている方法については、Ausbelら(編), 「分子生物学の今日のプロトコール」"Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, 「遺伝子移送と発現、実験室マニュアル」"Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual", Stockton Press, NY; および、Dracopoliら(編), 1994, 「ヒト遺伝学の今日のプロトコール」"Current Protocols in Human Genetics"の第12章と13章, John Wiley & Sons, NYGolberre-Garapinら, 1981, J. Mol. Biol. 150:1に述べられている

抗体の発現レベルは、ベクターの増幅によって増大させることができる(総説として、BebbingtonとHentschel, 「DNAクローニングにおける、哺乳類細胞内でのクローン化された遺伝子の発現のための遺伝子増幅に基づくベクターの使用」"The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning", 第3巻(Academic Press, New York, 1987)を参照されたい)。抗体を発現しているベクター系のマーカーが増幅可能なものである場合には、宿主細胞の培養液中に存在するインヒビターのレベルが増加すれば、マーカー遺伝子のコピー数が増加することとなる。その増幅された領域は抗体の塩基配列を伴っているので、その抗体の産生もまた増大することとなる(Crouseら, 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257)。

【００９８】

該宿主細胞は2種類の本発明の発現ベクターを用いて同時トランスフェクトしてもよく、該第1のベクターは重鎖由来ポリペプチドをコードし、該第2のベクターは軽鎖由来ポリペプチドをコードする。これらの2つのベクターは同一の選択マーカーを含むことができ、それによって重鎖および軽鎖のポリペプチドの等量の発現が可能となる。あるいはまた、重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドの双方をコードする単一のベクターを用いてもよい。その場合は、毒性のある遊離の重鎖が過剰に存在しないように、軽鎖は重鎖より前に配置すべきである(Proudfoot, 1986, Nature 322:52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197)。重鎖と軽鎖のコード配列は、cDNAであってもゲノムDNAであってもよい。

【００９９】

組換えによって抗体を発現させた後、該抗体は抗体の精製法として当該分野で既知の任意の方法によって精製することができ、そのような方法としては、例えば、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換、アフィニティー、特にプロテインAなどの特別な抗原に対するアフィニティー、およびサイズカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、溶解度差、また

はその他のタンパク質の精製のための任意の標準的技術が挙げられる。

【０１００】

5.5. 抗体コンジュゲート

ある実施形態においては、1種以上の癌細胞抗原、ウイルス抗原、または微生物抗原に対して免疫特異的な1種以上の抗体を治療用剤とコンジュゲートしてもよい。好ましい実施形態においては、抗C3b(i)抗体が診断用剤または治療用剤とコンジュゲートされる。該抗体は、例えば実施した治療計画の有効性を評価するために、例えば腫瘍の臨床検査法の一部として、腫瘍の拡大または進行をモニターするために診断的用途に用いられる。検出はその抗体を検出可能な物質とカプリングさせることによって行うことができる。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、種々の陽電子放出型断層撮影法に用いる陽電子放出金属、および非放射性常磁性金属イオンが含まれる。本発明での診断用途に用いるために抗体にコンジュゲートさせうる金属イオンについての一般的説明は、米国特許第4,741,900号を参照されたい。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれ；適切な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチン、およびアビジン/ビオチンが含まれ；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、またはフィコエリスリンが含まれ；発光物質の例としては、ルミノールが含まれ；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエコリンが含まれ；適切な放射性物質の例としては、$^{125}$I、$^{131}$I、$^{111}$In、または$^{99}$Tcが含まれる。

【０１０１】

さらに、抗体を細胞毒、例えば、細胞増殖抑止剤または細胞破壊剤、治療用剤、または放射性金属イオンなどの治療用部分にコンジュゲートさせてもよい。細胞毒または細胞破壊剤としては細胞にとって有害などのような作用物をも含む。例えば、パクリタキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにそれらの類縁体または相同体が含まれる。治療用剤としては、限定するものではないが、代謝拮抗剤(例えば、メトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシル、デカルバジン)、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、チオテパ、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)、およびロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびシス-ジクロロジアミン白金((II)(DDP)シスプラチン)、アントラサイクリン類(例えば、ダウノルビシン(以前はダウノマイシンと呼ばれていた)およびドキソルビシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(以前はアクチノマイシンと呼ばれていた)、ブレオマイシン、ミトラマイシン、アントラマイシン(AMC))、ならびに抗有糸分裂剤(例えばビンクリスチンおよびビンブラスチン)が含まれる。

【０１０２】

１つの実施形態においては、抗C3b(i)抗体はコブラ毒因子とコンジュゲートされる。本発明では、コブラ毒因子にコンジュゲートさせたC3b(i)特異的抗体はin vitroで、例えば癌を有する動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトから得た骨髄などの癌性細胞を減少させるために用いられる。抗体をコブラ毒因子にコンジュゲートさせる方法については、米国特許第5,773,243号に述べられており、本明細書中にその全体を参照として組み入れる。

【０１０３】

本発明のコンジュゲートはある生物学的応答を修飾するために用いることができ、従って治療用剤または薬剤部分とは古典的な化学的治療用剤に限定されるべきではない。例えば

、その薬剤部分は所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドとすることができる。そのようなタンパク質としては、例えば、アブリン、リシンA、シュードモナスの外毒素、またはジフテリア毒素などの毒素；腫瘍壊死因子、α-インターフェロン、β-インターフェロン、γ-インターフェロン、神経増殖因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲンアクチベーター、血栓形成剤（thrombotic agent）または抗血管新生剤、例えば、アンジオスタチンもしくはエンドスタチン；または、例えば、リンホカイン、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-15、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子("GM-CSF")、顆粒球コロニー刺激因子("G-CSF")、もしくはその他の増殖因子などの生体応答調節物質が含まれる。

【０１０４】

治療用剤の部分を抗体とコンジュゲートさせる技術はよく知られており、例えば、Arnonら，「癌治療における薬剤のイムノターゲティングのためのモノクローナル抗体」"Monoclonal Antibodies For Immunotargeteing Of Drugs In Cancer Therapy"，「モノクローナル抗体と癌治療」"Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy"中の記載，Reisfeldら(編)，pp.243-256(Alan R.Liss，Inc. 1985)；Hellstromら，「薬剤送達のための抗体」"Antibodies For Drug Delivery"，「制御された薬剤の送達」"Controlled Drug Delivery"(第2版)中の記載，Robinsonら(編)，pp.623-53(Marcel Dekker，Inc. 1987)；Thorpe，「癌治療における細胞傷害性薬剤の抗体キャリアー」"Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review”，「モノクローナル抗体'84：生物学的および臨床的応用」"Monoclonal Antiodies '84: Biological And Clinical Applications"中の記載，Pincheraら(編)，pp.475-506(1985)；「癌治療における放射性標識抗体の分析、結果、および将来の見通し」"Analysis，Results，And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy"，「癌の検出と治療のためのモノクローナル抗体」"Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy"中の記載，Baldwinら(編)，pp.303-16(Academic Press 1985)、およびThorpeら，「抗体-毒素コンジュゲートの調製と細胞傷害性」"The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugaates"，Immunol. Rev.，62:119-58(1982)；これらの各々は本明細書中に参照として組み入れる。

【０１０５】

あるいはまた、抗体を第2の抗体とコンジュゲートさせて抗体ヘテロコンジュゲートを形成させることができ、それはSegalが米国特許第4,676,980号で報告しており、この特許は本明細書中に参照として組み入れる。

【０１０６】

コンジュゲートされた治療用部分を持っている、または持っていない抗体は治療用剤として用いることができ、単独もしくは細胞毒因子および/またはサイトカインと組み合わせて投与することができる。

【０１０７】

5.6. in vitroにおける癌性細胞の減少

本発明は癌性細胞を非癌性組織および/または細胞からin vitro(またはex vivo)で減少させる方法を提供する。とりわけ、本発明は、癌性細胞を殺滅させることによって、または非癌性細胞から癌性細胞を分離することによって、癌性細胞を減少させる方法を提供する。１つの実施形態においては、抗C3b(i)抗体は単独で、もしくは血漿とともに、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトから得た組織および/または細胞とin vitroで混合する。別の実施形態においては、抗C3b(i)抗体単独、もしくはIgG抗体、IgM抗体、および/または1つ以上の補体成分とともに、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトから得た組織および/または細胞とin vitroで混合する。別の実施形態においては、抗C3b(i)抗体単独、もしくは癌細胞抗原に免疫特異的な抗体とともに、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトから得た組織および／または細胞とin vitroで混合する。好ましくは、in vitroで非癌性細胞から癌性細胞を減少させるために動物から得た組織は、骨髄および/または末梢血である。

【０１０８】
特別な実施形態においては、C3b(i)に免疫特異的なモノクローナル抗体をin vitroで動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトから得た組織および／または細胞とともにインキュベートする。好ましい実施形態においては、該モノクローナル抗体は、癌細胞と結合するIgMまたはIgG抗体に共有結合で連結されたC3b(i)に免疫特異的なものである。別の好ましい実施形態においては、該モノクローナル抗体は、癌細胞上の糖タンパク質または糖脂質、CD20、Her2、またはPSMAと共有結合で連結されたC3b(i)に対して免疫特異的なものである。
【０１０９】
好ましい実施形態においては、C3b(i)およびエフェクター細胞のレセプターまたは抗原に対して免疫特異的な二重特異性抗体は、in vitroで動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトから得た組織および／または細胞とインキュベートされる。別の好ましい実施形態においては、C3b(i)および補体成分(例えば、C1q)に対して免疫特異的な二重特異性抗体は、in vitroで動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトから得た組織および／または細胞とインキュベートされる。特別な実施形態においては、C3b(i)および補体成分(例えば、C1q)に対して免疫特異的な抗体フラグメントである二重特異性抗体は、in vitroで動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトから得た組織および／または細胞とインキュベートされる。この実施形態では、該二重特異性抗体は、補体が介在する癌細胞の溶解を促進する。
【０１１０】
本発明では、in vitroで組織から癌細胞を減少させるために用いられる抗C3b(i)抗体は検出可能な物質(例えば、種々の酵素、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、および放射性物質)または治療用剤(例えば、細胞増殖抑止剤および細胞破壊剤)とコンジュゲートしてもよく、それらについては第5.5節に開示している。例えば、抗C3b(i)抗体は、癌細胞を溶解するための補体活性の増強に用いるためにコブラ毒因子とコンジュゲートしてもよい。特別な実施形態においては、このように癌性細胞を減少させた組織および／または細胞が動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに投与される。好ましい実施形態においては、癌の治療が行われる前に癌を有する動物から組織および／または細胞を得て、治療後に癌性細胞を減少させた組織および／または細胞をその動物に投与する。また別の実施形態においては、抗C3b(i)抗体を用いた癌性細胞の減少は自己の骨髄、または末梢血幹細胞の投与の前に行われる。
【０１１１】
検出可能な物質とコンジュゲートさせた抗C3b(i)抗体は、当業者には既知の方法により、非癌性細胞から癌性細胞を分離するために用いることができる。１つの実施形態においては、癌性細胞は蛍光細胞分析分離装置(FCAS)を用いて分離される。蛍光細胞分析分離装置(FACS)は、粒子の蛍光特性に基づいて、該粒子（細胞をも含む）を分離するための周知の方法である(Kamarch, 1987,, Methods Enzymol. 141:150-165)。個々の粒子の蛍光部分をレーザーで励起させることによって小さな電荷がもたらされ、それによって混合物からの正に荷電した粒子と負に荷電した粒子の電磁的分離が可能となる。
【０１１２】
１つの実施形態においては、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトから得た細胞、特に骨髄細胞または末梢血幹細胞を、蛍光標識したC3b(i)特異的抗体と、その標識抗体が細胞と結合するために十分な時間(例えば、10分間、20分間、30分間、45分間、60分間、90分間、120分間、またはそれ以上)、好ましくは10分間から60分間の間の時間、インキュベートする。また別の実施形態においては、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトから得た細胞、特に骨髄細胞または末梢血幹細胞を、C3b(i)特異的抗体とインキュベートし、該細胞を洗い、さらに該細胞を、C3b(i)特異的抗体を認識する第2の標識抗体とインキュベートする。これらの実施形態では、細胞はセルソーターを介して洗浄され、処理され、双方の抗体と結合する細胞を、双方の抗体の両方には結合しないハイブリッド細胞から分離することができる。FACSによってソートされた粒子は直接的に96ウエルまたは

384ウエルのプレートの各ウエルに入れて分離を促進することができる。

【０１１３】

別の実施形態においては、磁性ビーズを非癌性細胞から癌性細胞を分離するために用いることができる。癌性細胞は磁気活性化細胞分離(MACS)技術を用いて分離することができ、この方法は粒子をその磁性ビーズ(直径0.5～100nm)への結合能に基づいて分離する方法である(Dynal, 1995)。その磁性微粒子については種々の有用な修飾を行うことができ、そのようなものとしては、C3b(i)を免疫特異的に認識する抗体の共有結合による付加が含まれる。次いで、選択されたビーズを物理的に処理するために磁場がかけられる。次にそれらのビーズを細胞と混合して結合させる。次いで細胞を磁場を通過させて癌性細胞を分離する。

【０１１４】

5.7. 抗C3b(i)抗体の治療的および予防的使用

本発明は癌の治療もしくは予防を提供し、その癌としては、限定するものではないが、新生物、腫瘍、転移が、または制御し得ない細胞の増殖で特徴づけられる全ての疾病や障害も含まれ、その治療もしくは予防は、抗C3b(i)抗体もしくはその抗体をコードする核酸分子を治療上もしくは予防上有効な量投与することによるものである。癌および増殖性障害のタイプの例としては、限定するものではないが、白血病(例えば、骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、赤白血病、慢性骨髄性(顆粒球性)白血病、および慢性リンパ球性白血病)、リンパ腫(例えば、ホジキン病、および非ホジキン病)、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、血管肉腫、内皮肉腫、ユーイング腫瘍、大腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌, 腺癌、腎細胞癌、肝臓癌、ウィルムス腫瘍、子宮頚癌、子宮癌、精巣腫瘍、肺癌、肺小細胞癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、乏突起膠腫、悪性黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、異形成および過形成が含まれる。特定の実施形態においては、本発明の治療用化合物は前立腺癌(例えば、前立腺炎、良性の前立腺肥大、良性の前立腺過形成(BPH)、前立腺傍神経節腫、前立腺癌、前立腺上皮内腫瘍、前立腺-直腸瘻、および非典型的前立腺間質性病変)を有する男性に投与される。癌の治療および／または予防としては、限定するものではないが、癌に伴う1種以上の症状の緩和、癌の進行の阻害もしくは低減、癌の退縮の促進、および/または、免疫応答の促進が含まれる。１つの実施形態においては、市販のもしくは天然の、C3b(i)抗体、その機能的に活性なフラグメントもしくは誘導体が本発明で用いられる。

【０１１５】

特定の実施形態においては、本発明の組成物が癌に伴う1種以上の症状の改善のために動物に投与される。その他の特定の実施形態においては、本発明の組成物は癌の進行の阻害もしくは低減のために動物に投与される。その他の特定の実施形態においては、本発明の組成物が癌の退縮の促進のために動物に投与される。

【０１１６】

特別な実施形態においては、治療上有効な量の1種以上の抗C3b(i)抗体を含んでなる組成物が癌に伴う1種以上の症状の改善のために動物に投与される。別の実施形態においては、治療上有効な量の1種以上の抗C3b(i)抗体を含んでなる組成物が癌の退縮の促進、および/または癌の進行の阻害もしくは低減のために動物に投与される。別の実施形態においては、治療上有効な量の1種以上の抗C3b(i)抗体および1種以上の癌細胞抗原に対して免疫特異的な1種以上の抗体を含んでなる組成物が癌に伴う1種以上の症状の改善のために動物に投与される。また別の実施形態においては、治療上有効な量の1種以上の抗C3b(i)抗体および1種以上の癌細胞抗原に対して免疫特異的な1種以上の抗体を含んでなる組成物が癌の退縮の促進、および/または癌の進行の阻害もしくは低減のために動物に投与される。

【０１１７】

抗C3b(i)抗体は単独で、または他のタイプの癌治療法(例えば、放射線療法、化学療法、ホルモン療法、免疫療法、および抗腫瘍剤)と組み合わせて投与することができる。抗腫瘍剤の例としては、限定するものではないが、シスプラチン、イフォスファミド、パクリタキセル、タキサン、トポイソメラーゼIインヒビター(例えば、CPT-11、トポテカン、9-

AC、およびGG-211)、ゲムシタビン、ビノレルビン、オキサリプラチン、5-フルオロウラシル(5-FU)、ロイコボリン、ビノレルビン、テモダール、およびタキソールが含まれる。１つの実施形態においては、癌の外科的切除の後に、1種以上の抗C3b(i)抗体が動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに投与される。別の実施形態においては、化学療法または放射線療法とともに、1種以上の抗C3b(i)抗体が動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに投与される。別の実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体は、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに、血漿のその動物への投与に先立って(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間前に)、それに引き続いて(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間後に)、またはそれと同時に、癌の予防または治療のために投与される。

【０１１８】

好ましい実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体は、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに、IgG抗体、IgM抗体、および/または1種以上の補体成分のその動物への投与に先立って(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間前に)、それに引き続いて(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間後に)、またはそれと同時に、癌の予防または治療のために投与される。別の好ましい実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体は、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに、1種以上の癌細胞抗原に対して免疫特異的な抗体のその動物への投与に先立って(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間前に)、それに引き続いて(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間後に)、またはそれと同時に、癌の予防または治療のために投与される。また別の好ましい実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体は、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに、癌治療に現在用いられている抗体のその動物への投与に先立って(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間前に)、それに引き続いて(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間後に)、またはそれと同時に、癌の予防または治療のために投与される。そのような現在癌治療に用いられている抗体の例としては、限定するものではないが、Herceptin(登録商標)、Retuxan(登録商標)、OvaRex、Panorex、BEC2、IMC-C225、Vitaxin、Campath I/H、Smart MI95、LymphoCide、Smart ID10、およびOncolymが含まれる。

【０１１９】

特別な実施形態においては、前立腺癌を有する男性に抗C3b(i)抗体の投与がアンドロゲン除去療法とともに行われる。別の実施形態においては、非ホジキンリンパ腫の患者は、抗C3b(i)抗体の投与に先立ってRetuxan(登録商標)での治療を受ける。特定の実施形態においては、癌となる危険性の高い動物に本発明の組成物が投与される。そのような動物の例としては、限定するものではないが、乳癌に罹患しやすいヒトが含まれる。

【０１２０】

本発明は動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトのウイルス感染の治療もしくは予防のための方法を提供し、その方法は、抗C3b(i)抗体またはその抗体をコードする核酸分子の治療上または予防上有効な量を投与することを含んでなる。本発明で治療もしくは予防することのできるウイルス感染の例としては、限定するものではないが、レトロウイルス(例えば、ヒトT細胞リンパ球親和性ウイルス(HTLV)I型およびII型、ならびにヒト免疫不全ウイルス(HIV))、ヘルペスウイルス(例えば、単純ヘルペスウイルス(HSV)I型およびII型、EBウイルス、ならびにサイトメガロウイルス)、アレナウイルス(例えば、ラッサ熱ウイルス)、パラミクソウイルス(例えば、モルビリウイルス、ヒト呼吸器合胞体ウイルス、および肺炎ウイルス)、アデノウイルス、ブニヤウイルス(例えば、ハンタウイルス)、コロナウイルス、フィロウイルス(例えば、エボラウイルス)、フラビウイルス(例えばC型

肝炎ウイルス(HCV)、黄熱病ウイルス、および日本脳炎ウイルス、ヘパドナウイルス(例えば、B型肝炎ウイルス(HBV))、オルソミクソウイルス(例えば、センダイウイルスならびにインフルエンザウイルスA，B，およびC)、パポバウイウルス(例えば、パピローマウイルス)、ピコナウイルス(例えばライノウイルス、エンテロウイルス、およびA型肝炎ウイルス)、ポックスウイルス、レオウイルス(例えばロタウイルス)、トガウイルス(例えば風疹ウイルス)、ならびにラブドウイルス(例えば、狂犬病ウイルス)によって引き起こされるウイルス感染が含まれる。ウイルス感染の治療および／または予防としては、限定するものではないが、感染に伴う1種以上の症状の緩和、ウイルス複製の阻害、低減、もしくは抑制、および/または、免疫応答の増強が含まれる。

【０１２１】

特定の実施形態においては、本発明の組成物は、ウイルス感染、またはウイルス感染から直接的もしくは間接的にもたらされる疾患もしくは障害に伴う1種以上の症状の改善のために動物に投与される。特別な実施形態においては、本発明の組成物は、AIDSに伴う1種以上の症状の改善のためにヒトに投与される。その他の特定の実施形態においては、本発明の組成物は、動物体内のウイルスの力価を低減するために投与される。その他の特定の実施形態においては、本発明の組成物は免疫応答を増強または促進するために動物に投与される。

【０１２２】

特別な実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体の治療上有効な量を含んでなる組成物が、ウイルス感染に伴う1種以上の症状の改善のために動物に投与される。別の実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体の治療上有効な量を含んでなる組成物が、動物体内のウイルスの力価を低減するために動物に投与される。別の実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体と1種以上のウイルス抗原に対して免疫特異的な1種以上の抗体の治療上有効な量を含んでなる組成物が、ウイルス感染に伴う1種以上の症状の改善のために動物に投与される。また別の実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体と1種以上のウイルス抗原に対して免疫特異的な1種以上の抗体の治療上有効な量を含んでなる組成物が、動物体内のウイルスの力価を低減するために動物に投与される。

【０１２３】

抗C3b(i)抗体は単独で、または他のタイプの抗ウイルス剤と組み合わせて投与することができる。抗ウイルス剤の例としては、限定するものではないが、サイトカイン(例えばIFN-α、IFN-β、およびIFN-γ)；逆転写酵素のインヒビター(たとえば、AZT、3TC、D4T、ddC、d4T、3TC、アデフォビル、エファビレンツ、デラビルジン、ネビラピン、アバカビル、およびその他のジデオキシヌクレオシドまたはジデオキシフルオロヌクレオシド)；リバビリンなどのウイルスmRNAキャッピングのインヒビター；HIVプロテアーゼインヒビターなどのプロテアーゼのインヒビター(例えば、アンプレナビル、インジナビル、ネルフィナビル、リトナビル、およびサキナビル)；アムホテリシンB、糖タンパク質のプロセシングのインヒビターであるカタノスペルミン；インフルエンザウイルスノイラミニダーゼインヒビターなどのノイラミニダーゼのインヒビター(例えばザナミビルおよびオセルタミビル)；トポイソメラーゼIインヒビター(例えばカンプトテシン、およびその類縁体)；アマンタジン；ならびにリマンタジンが含まれる。これらの抗ウイルス剤は、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに、その動物への抗C3b(i)抗体の投与に先立って(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間前に)、それに引き続いて(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間後に)、またはそれと同時に、ウイルス感染の予防または治療のために投与することができる。

【０１２４】

特別な実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体は、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに、その動物への血漿の投与に先立って(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間前に)、それに引き続いて(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時

間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間後に)、またはそれと同時に、ウイルス感染の予防または治療のために投与することができる。

【０１２５】

好ましい実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体は、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに、その動物へのIgG抗体、IgM抗体、および／または1種以上の補体成分の投与に先立って(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間前に)、それに引き続いて(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間後に)、またはそれと同時に、ウイルス感染の予防または治療のために投与することができる。別の好ましい実施形態においては、抗C3b(i)抗体は、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに、その動物への1種以上のウイルス抗原に対して免疫特異的な抗体の投与に先立って(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間前に)、それに引き続いて(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間後に)、またはそれと同時に、ウイルス感染の予防または治療のために投与することができる。ウイルス抗原に対して免疫特異的な抗体の例としては、限定するものではないが、Synagis(登録商標)、PRO542、Ostavir、およびProtovirが含まれる。

【０１２６】

本発明は動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトの微生物感染の治療もしくは予防のための方法を提供し、その方法は、抗C3b(i)抗体またはその抗体をコードする核酸分子の治療上または予防上有効な量を投与することを含んでなる。本発明で治療もしくは予防することのできる微生物感染の例としては、限定するものではないが、酵母感染、心筋感染、原生動物感染、および細菌感染が含まれる。微生物感染を引き起こす細菌としては、限定するものではないが、可能性連鎖球菌(Streptococcus pyogenes)、肺炎連鎖球菌(Streptococcus pneumoniae)、淋菌(Neisseria gonorrhoea)、髄膜炎菌(Neisseria meningitidis)、ジフテリア菌(Corynebacterium diphtheriae)、ボツリヌス菌(Clostridium botulinum)、ウェルシュ菌(Clostridium perfringens)、破傷風菌(Clostridium tetani)、インフルエンザ菌(Haemophilus influenzae)、肺炎桿菌(Klebsiella pneumoniae)、Klebsiella ozaenae、Klebsiella rhinoscleromotis、黄色ブドウ球菌(Staphlococcus aureus)、コレラ菌(Vibrio cholerae)、大腸菌(Escherichia coli)、緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)、Campylobacter(Vibrio) fetus、Campylobacter jejuni、Aeromonas hydrophila、Bacillus cereus、Edwardsiella tarta、Yersinia enterocolitica、ペスト菌(Yersinia pestis)、Yersinia pseudotuberculosis、赤痢菌(Shigella dysenteriae)、Shigella flexneri、Shigella sonnei、ネズミチフス菌(Salmonella typhimurium)、梅毒トレポネーマ(Treponema pallidum)、Treponema pertenue、Treponema carateneum、Borrelia vincentii、ライム病菌(Borrelia burgdorferi)、Leptospira icterohemorrhagiae、結核菌(Mycobacterium tuberuculosis)、Toxoplasma gondii、Pneumocystis calini、Francisella tularensis, Brucella abortus、Brucella suis、Brucella melitensis、Mycoplasma spp.、発疹チフスリケッチア(Rickettsia prowazeki)、ツツガムシ病リケッチア(Rickettsia tsutsugumushi)、 Chlamidia spp., およびヘリコバクター・ピロリ（Helicobacter pylori）が含まれる。微生物感染の治療および／または予防とは、限定するものではないが、感染に伴う1種以上の症状の緩和、微生物複製の阻害、低減、もしくは抑制、および/または、免疫応答の増強が含まれる。

【０１２７】

特定の実施形態においては、本発明の組成物は、微生物感染、または微生物感染から直接的もしくは間接的にもたらされる疾患もしくは障害に伴う1種以上の症状の改善のために動物に投与される。その他の特定の実施形態においては、本発明の組成物は、動物体内の微生物数を低減するために投与される。

【０１２８】

特別な実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体の治療上有効な量を含んでなる組成物が、微生物感染に伴う1種以上の症状の改善のために動物に投与される。別の実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体の治療上有効な量を含んでなる組成物が、動物体内の微生物数を低減するために動物に投与される。別の実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体と1種以上の微生物抗原に対して免疫特異的な1種以上の抗体の治療上有効な量を含んでなる組成物が、微生物感染に伴う1種以上の症状の改善のために動物に投与される。また別の実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体と1種以上の微生物抗原に対して免疫特異的な1種以上の抗体の治療上有効な量を含んでなる組成物が、動物体内の微生物数を低減するために動物に投与される。

【０１２９】

抗C3b(i)抗体は単独で、または他のタイプの抗微生物剤と組み合わせて投与することができる。抗微生物剤の例としては、限定するものではないが、ペニシリン、アモキシシリン、アンピシリン、カルベニシリン、チカルシリン、ピペラシリン、セファロスポリン、バンコマイシン、テトラサイクリン、エリスロマイシン、アムホテリシンB、ナイスタチン、メトロニダゾール、ケトコナゾール、およびペンタミジンなどの抗生物質が含まれる。これらの抗微生物剤は、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに、その動物への抗C3b(i)抗体の投与に先立って(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間前に)、それに引き続いて(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間後に)、またはそれと同時に、微生物感染の予防または治療のために投与することができる。

【０１３０】

特別な実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体は、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに、その動物への血漿の投与に先立って(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間前に)、それに引き続いて(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間後に)、またはそれと同時に、微生物感染の予防または治療のために投与することができる。

【０１３１】

好ましい実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体は、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに、その動物へのIgG抗体、IgM抗体、および／または1種以上の補体成分の投与に先立って(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間前に)、それに引き続いて(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間後に)、またはそれと同時に、微生物感染の予防または治療のために投与することができる。別の好ましい実施形態においては、抗C3b(i)抗体は、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに、その動物への1種以上の微生物抗原に対して免疫特異的な抗体の投与に先立って(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間前に)、それに引き続いて(例えば、投与の1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または1週間後に)、またはそれと同時に、微生物感染の予防または治療のために投与することができる。微生物抗原に対して免疫特異的な抗体の例としては、限定するものではないが、LPSおよび莢膜多糖5/8に対して免疫特異的な抗体が含まれる。特定の実施形態においては、ウイルスもしくは細菌感染の危険性の高い動物に本発明の組成物が投与される。そのような動物の例としては、限定するものではないが、ヒトの火傷患者、幼児、免疫低下状態もしくは免疫不全状態のヒト、および高齢者が含まれる。

【０１３２】

本発明は、循環血液中に放出されうる、リポ多糖(LPS)、エンドトキシン、もしくはグラム陰性細菌の細胞外壁の構成物によって引き起こされる敗血症性ショックの治療もしくは予防のための方法を提供する。特別な実施形態においては、抗C3b(i)抗体は動物、好まし

くは哺乳類、最も好ましくはヒトに敗血症性ショックを治療または予防するために投与される。特定の実施形態においては、敗血症性ショックの危険性の高い動物に本発明の組成物が投与される。そのような動物の例としては、限定するものではないが、ヒトの火傷患者、幼児、免疫低下状態もしくは免疫不全状態のヒト、および高齢者が含まれる。

【０１３３】

特別な実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体は、動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトに、その動物への敗血症性ショックの治療もしくは予防のための任意の既知の技術に先立って(例えば、15分、30分、45分、1時間、2時間、6時間、12時間、または24時間前に)、それに引き続いて(例えば、15分、30分、45分、1時間、2時間、6時間、12時間、または24時間後に)、またはそれと同時に投与される。敗血症性ショックの治療または予防のための既知の技術の例としては、限定するものではないが、アンチトロンビン、静注用免疫グロブリン、サイトカインアンタゴニスト(例えば、抗腫瘍壊死因子(TNF)抗体、可溶性TNFレセプター、抗インターロイキン-1(IL-1)抗体、および可溶性IL-1レセプター)、抗生物質、ならびに抗炎症剤が含まれる。敗血症性ショックの治療および/または予防には、限定するものではないが、敗血症性ショックに伴う1種以上の症状の緩和、および免疫応答の増強が含まれる。

【０１３４】

特別な実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体の治療上有効な量を含んでなる組成物が、敗血症性ショックに伴う1種以上の症状の改善のために動物に投与される。別の実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体とIgGおよび／またはIgM濃縮血漿の治療上有効な量を含んでなる組成物が、敗血症性ショックに伴う1種以上の症状の改善のために動物に投与される。別の実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体と1種以上の補体成分の治療上有効な量を含んでなる組成物が、敗血症性ショックに伴う1種以上の症状の改善のために動物に投与される。また別の実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体とリポ多糖に対して免疫特異的な1種以上の抗体の治療上有効な量を含んでなる組成物が、敗血症性ショックに伴う1種以上の症状の改善のために動物に投与される。

【０１３５】

一般的には、患者と同じ起源または反応性(抗体の場合)を有するものの投与が好ましい。従って、好ましい実施形態においては、ヒト抗C3b(i)抗体、誘導体、類縁体、もしくは核酸が治療もしくは予防のためにヒトの患者に投与される。

【０１３６】

5.7.1. 遺伝子治療

本発明は、1種以上の抗C3b(i)抗体をコードする核酸分子を投与することを含んでなる、癌、ウイルス感染、および微生物感染の治療または予防のための方法を提供する。特別な実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体をコードする配列を含んでなる核酸は、遺伝子治療法による癌、ウイルス感染、または微生物感染の治療または予防のために投与される。別の実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体および1種以上の癌抗原に対して免疫特異的な抗体をコードする配列を含んでなる核酸が、遺伝子治療法による癌の治療または予防のために投与される。別の実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体および1種以上のウイルス抗原もしくは微生物抗原に対して免疫特異的な抗体をコードする配列を含んでなる核酸が、遺伝子治療法によるウイルス感染または微生物感染の治療または予防のために投与される。また別の実施形態においては、1種以上の抗C3b(i)抗体および1種以上の補体成分をコードする配列を含んでなる核酸が、遺伝子治療法によるウイルス感染または微生物感染の治療または予防のために投与される。遺伝子治療法とは、被験者に発現されている、または発現可能な核酸を投与することによって行われる治療法を意味する。本発明のこの実施形態においては、該核酸は、それらがコードしている、予防的または治療的作用に介在するタンパク質を産生する。

【０１３７】

当該分野で利用可能な遺伝子治療のための方法のいかなるものでも本発明で用いることができる。代表的な方法を下記に述べる。

【０１３８】
遺伝子治療の方法の総説としては、Goldspielら，1993，Clinical Pharmacy 12:488-505；WuとWu，1991，Biotherapy 3:87-95；Tolstoshev，1993，Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596；Mulligan，1993，Science 260:926-932；およびMorganとAnderson，1993，Ann. Rev. Biochem. 62:191-217；May，1993，TIBTECH 11(5):155-215を参照されたい。組換えDNA技術の業界で一般的に知られており、用いることのできる方法については、Ausubelら(編)，1993，「分子生物学の今日のプロトコール」"Current Protocols in Molecular Biology"，John Wiley & Sons，NY；およびKriegler，1990，「遺伝子の移送と発現、実験室マニュアル」"Gene Transfer and Expression，A Laboratory Manual"，Stockton Press，NYに述べられている。

【０１３９】
１つの態様においては、発現ベクター中に1種以上の抗C3b(i)抗体、癌抗原、ウイルス抗原、もしくは微生物抗原に対して免疫特異的な1種以上の抗体、および/または1種以上の補体成分、それらをコードする核酸配列を含んでなる組成物が適切な宿主に投与される。抗C3b(i)抗体、癌抗原、ウイルス抗原、もしくは微生物抗原に対して免疫特異的な抗体、および/または補体成分をコードする核酸配列の発現は、任意の当業者には既知の誘導可能な、構成的な、または組織特異的なプロモーターで調節することができる。特別な実施形態においては、遺伝子治療の目的で導入される核酸は、コーディング領域に機能しうる形で連結された誘導可能なプロモーターを含んでなるものとすることができ、それによって、転写の適切な誘導剤の存在または不在を制御することによってその核酸の発現が制御されることとなる。

【０１４０】
特別な実施形態においては、抗C3b(i)抗体、癌抗原、ウイルス抗原、もしくは微生物抗原に対して免疫特異的な抗体、および/または補体成分、およびその他の所望の配列をコードする核酸分子は、ゲノム中の所望の位置で相同組換えを促進する領域に隣接しておかれ、該コード領域の染色体内発現が行われる(KollerとSmithies，1989,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935；Zijlstraら，1989，Nature 342:435-438)。

【０１４１】
該核酸の患者体内への送達は直接的（その場合、患者はその核酸または核酸を運搬するベクターに直接的にさらされる）であっても、または間接的（その場合に、まずin vitroで細胞がその核酸で形質転換され、次いでその細胞が患者体内へ移植される）であってもよい。これらの2つのアプローチはそれぞれin vivo、またはex vivo遺伝子治療法として知られている。

【０１４２】
特別な実施形態においては、該核酸配列は直接的にin vivoで投与され、in vivoで発現されてコードされた産物が発現される。これは、任意の当該分野では既知の非常に多数の方法によって、例えば、該核酸配列を適切な核酸発現ベクターの一部として構築し、それを細胞内に入るように投与することによって行うことができるが、それは例えば、欠損のある、または弱毒化したレトロウイルスまたはその他のウイルスベクター(米国特許第号を参照されたい)を用いて感染させることによって、または裸のDNAを直接注入することによって、またはマイクロパーティクルガン法(例えば、遺伝子銃；Biolistic，Dupont)、または脂質もしくは細胞表面のレセプターもしくはトランスフェクト剤によるコーティング、リポソーム、微粒子、もしくはマイクロカプセル中への被包、または該核酸配列の核への移入が知られているペプチドに連結させて投与すること、または該核酸配列をリガンドと連結させてレセプターが介在するエンドサイトージスにかけることによって(例えば、WuとWu，1987，J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照されたい)(この方法は該レセプターを特異的に発現している細胞タイプを標的とするために用いることができる)等の方法で行うことができる。別の実施形態においては、核酸-リガンド複合体は、その中のリガンドがエンドソームを破壊するための融合性のウイルスペプチドを含んでなるように形成することができ、それによって該核酸のリポソームによる分解を避けることができる。また

別の実施形態においては、該核酸はin vivoで、特異的なレセプターを標的として狙うことによって、細胞特異的な取り込みと発現の標的とされうる(例えば、PCT公開 WO 92/06180, 1992年4月16日付(Wuら); WO 92/22635, 1992年12月23日付(Wilsonら); WO 92/20316, 1992年11月26日付(Findeisら); WO 93/14188, 1993年7月22日付(Clarkeら); WO 93/20221, 1993年10月14日付(Young)を参照されたい)。あるいはまた、相同組換えによって、該核酸を細胞内に導入して宿主細胞のDNA中に発現のために組み入れることができる(KollerとSmithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; Zijlstraら, 1989, Nature 342:435-438)。

【０１４３】

特別な実施形態においては、ウイルスベクターが核酸配列を発現させるために用いられる。例えば、レトロウイルスベクターを用いることができる(Millerら, 1993, Meth. Enzymol. 217:581-599)。それらのレトロウイルスベクターはウイルスゲノムのパッケージングと、宿主細胞のDNAへの組み込みに必要でないレトロウイルス配列を削除したものが用いられてきた。遺伝子治療に用いられることとなる該抗体および/または補体成分をコードする核酸配列は1種以上のベクター中にクローン化され、それによって該遺伝子の患者への送達が容易となる。レトロウイルスベクターに関してのより詳細な説明は、Boesenら, 1994, Biotherapy 6:291-302中に記載されており、その論文では、幹細胞の化学療法に対しての抵抗性をより強くするためにmdr1遺伝子の造血幹細胞への送達のためのレトロウイルスベクターの使用について報告している。遺伝子治療におけるレトロウイルスベクターの使用を説明している他の参照文献としては次のとおり；Clowesら, 1994, J. Clin. Invest. 93:644-651; Kiemら, 1994, Blood 83:1467-1473; SalmonsとGunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4:129-141; およびGrossmanとWilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114。

【０１４４】

アデノウイルスは遺伝子治療で用いうる別のウイルスベクターである。アデノウイルスは遺伝子を呼吸上皮へ送達するためのヴィークルとしては特に魅力的である。アデノウイルスは呼吸上皮に自然感染し、そこで軽度の疾患を起こす。アデノウイルスをベースとした送達システムの他の標的としては、肝臓、中枢神経系、内皮細胞、および筋肉がある。アデノウイルスは分裂していない細胞に感染することができるという利点を有している。KozarskyとWilson, 1993, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503は、アデノウイルスをベースとする遺伝子治療について総説している。Boutら, 1994, Human Gene Therapy 5:3-10は、アカゲザルの呼吸上皮への遺伝子の移送のためのアデノウイルスベクターの使用を説明している。アデノウイルスの遺伝子治療におけるその他の使用例については、Rosenfeldら, 1991, Science 252:431-434; Rosenfeldら, 1992, Cell 68:143-155; Mastrangeliら, 1993, J. Clin. Invest. 91:225-234; PCT公開WO 94/12649; およびWangら, 1995, Gene Therapy 2:775-783に述べられている。好ましい実施形態においては、アデノウイルスベクターは抗体および/または補体成分を本発明の方法に従って動物に送達するために用いられる。

【０１４５】

アデノ関連ウイルス(AAV)も遺伝子治療での使用が提案されている(Walshら, 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300; 米国特許第5,436,146号)。１つの実施形態においては、AAVベクターは本発明の方法に従って動物に抗体および/または補体成分を送達するために用いられる。

【０１４６】

遺伝子治療の別のアプローチとしては、遺伝子を電気穿孔法、リポフェクション、リン酸カルシウムが介在するトランスフェクション、またはウイルス感染などの方法を用いて組織培養液中の細胞への移送を含んでいる。通常は、移送の方法には選択マーカーのその細胞への移送が含まれる。次いでその細胞を選択にかけて、移送された遺伝子を取り込んで発現している細胞を単離する。次いでそれらの細胞を患者に送達する。

【０１４７】

この実施形態においては、該核酸をまず細胞に導入した後に、その結果得られた組換え細胞をin vivoで投与する。そのような細胞への導入は当該分野では既知の任意の方法で行うことができ、そのような方法としては、限定するものではないが、トランスフェクション、電気穿孔法、マイクロインジェクション、該核酸を含んでいるウイルスベクターもしくはバクテリオファージベクターでの感染、細胞融合、染色体が介在する遺伝子移送、マイクロセルが介在する遺伝子移送、スフェロプラスト融合等が含まれる。外来性遺伝子の細胞内への導入のための技術は当該分野では多数知られており(例えば、LefflerとBehr, 1993, Meth. Enzymol. 217:599-618; Cohenら, 1993, Meth. Enzymol. 217:618-644; Cline, 1985, Pharmac. Ther. 29:69-92)、該核酸を受け取るレシピエントの細胞に必要な発達と生理学的機能が壊されない限りは、本発明で用いることができる。該技術は該核酸の細胞への安定な移送を行えるものでなければならず、それによって該核酸はその細胞によって発現可能となり、好ましくはその細胞の子孫に遺伝されて発現可能なものである。

【０１４８】

この結果得られた細胞は当該分野では既知の種々の方法によって患者へと送達することができる。組換え血液細胞(例えば、造血幹細胞、または前駆細胞)は静脈内投与することが好ましい。用いられる細胞の量は、所望の作用、患者の状態等によって変わり、当業者であれば決定することができる。

【０１４９】

遺伝子治療の目的で核酸が導入される細胞は、所望の、利用可能な細胞のタイプのいかなるものも包含し、そのようなものとしては、限定するものではないが、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋細胞、肝細胞、血液細胞(例えば、Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、および顆粒球)、ならびに種々の幹細胞もしくは前駆細胞、特に造血幹細胞もしくは造血前駆細胞があり、例えば骨髄、臍帯血、末梢血、胎児肝等から得られる。

【０１５０】

好ましい実施形態においては、遺伝子治療に用いられる細胞はその患者にとって自家のものである。

【０１５１】

遺伝子治療に組換え細胞が用いられる１つの実施形態においては、C3b(i)抗体、癌抗原、ウイルス抗原、もしくは微生物抗原に免疫特異的な抗体、および/または補体成分をコードする核酸配列は、細胞中に導入され、該細胞もしくはその子孫において発現され、次いでその組換え細胞は治療効果を期待してin vivoで投与される。特別な実施形態においては、幹細胞または前駆細胞が用いられる。単離が可能でin vitroで維持しうるものであればいかなる幹細胞および/または前駆細胞であっても本発明のこの実施形態で用いることができる(例えば、PCT公開 WO 94/08598, 1994年4月28日; StempleとAnderson, 1992, Cell 71:973-985; Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A:229; およびPittelkowとScott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771を参照されたい)。

【０１５２】

5.8. 治療的または予防的有用性の証明

本発明の組成物は好ましくは、ヒトに用いることに先立ってin vitroで試験し、次いでin vivoで所望の治療活性または予防活性を試験する。例えば、ある組成物の治療的または予防的有用性を示すためのin vitroアッセイとしては、組成物の細胞系統に対する作用、特にある特定のタイプの癌、または患者の組織サンプルへの作用を調べることが含まれる。その組成物の細胞系統および/または組織サンプルへの作用は当業者には既知の技術を用いて測定することができ、そのようなものとしては、限定するものではないが、ロゼット形成アッセイおよび細胞溶解アッセイが含まれる。供試組成物は活性化された免疫細胞を増大させる能力について試験することができるが、それは活性化させた免疫細胞を供試組成物または対照の組成物と接触させてその供試組成物が活性化免疫細胞の生物学的活性を変調させる能力を測定することによって行うことができる。供試組成物の活性化免疫細胞の生物学的活性を変調させる能力は、サイトカインもしくは抗原の発現の検出、免疫細

胞の増殖の検出、シグナル分子の活性化の検出、免疫細胞のエフェクター機能の検出、または免疫細胞の分化の検出によって調べることができる。これらの活性の測定には当業者には既知の技術を用いることができる。例えば、細胞の増殖は、$^{3}$H-チミジン取り込みアッセイおよびトリパンブルーでの細胞数の計数によってアッセイすることができる。サイトカインと抗原の発現は例えば、イムノアッセイによって行うことができ、そのイムノアッセイとしては、限定するものではないが、ウエスタンブロット、免疫組織化学、ラジオイムノアッセイ、ELISA、"サンドイッチ"イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル散乱沈降反応、免疫散乱アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射性アッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイ、およびFACS分析などの競合および非競合アッセイ系が含まれる。シグナル分子の活性化は、例えば、キナーゼアッセイ、および電気易動度シフトアッセイ(EMSA)でアッセイすることができる。T細胞のエフェクター機能は、例えば、$^{51}$Cr放出アッセイ(例えば、Palladinoら, 1987, Cancer Res. 47:5074-5079とBlachereら, 1993, J. Immunotherapy 14:352-356を参照されたい)で測定することができる。

【０１５３】

供試組成物は、癌の患者(すなわち動物)における腫瘍形成の低減能を試験することができる。また、供試組成物はin vitroおよびin vivoで(例えば、感染症患者において)、ウイルスの投与量または細菌数を低減させる能力を、当業者には既知の技術を用いて試験することができる。また供試組成物は、癌もしくは感染症(例えば、ウイルス感染もしくは微生物感染)に伴う1種以上の症状を緩和する能力も試験することができる。また供試組成物は、感染症の時間経過を短縮させる能力も試験することができる。さらに、供試組成物は、癌もしくは感染症(例えば、ウイルス感染もしくは微生物感染)の患者の生存期間を延長させる能力も試験することができる。患者体内での供試組成物の機能を分析または試験するために当業者には既知の技術を用いることができる。

【０１５４】

本発明の種々の実施形態において、特別な1組成物の投与が行うか否かを決定するために用いることのできるin vitroアッセイ法としては、患者の組織サンプルを培養液中で増殖させ、組成物に暴露させるかまたはそうでなければ組成物を投与し、その組成物の組織サンプルに対する作用を観察する、in vitro細胞培養アッセイ法が含まれる。

【０１５５】

治療に用いるための組成物は、ヒトでの試験を行う前に適切な動物モデル系で試験することができ、そのような動物としては、限定するものではないが、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギ等が含まれる。in vivo試験には、ヒトに投与する前に、当該分野では任意の既知の動物モデル系を用いることができる。

【０１５６】

5.9. 組成物の治療/予防での投与

本発明は、本発明の組成物の有効量を動物(例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒト、その他)に投与することによる、癌、ウイルス感染、微生物感染、および敗血症性ショックの予防および治療方法を提供する。特定の実施形態においては、本発明の組成物はヒトの火傷患者、幼児、免疫低下状態もしくは免疫不全状態のヒト、または高齢者に投与される。本発明の組成物は下記のもののいずれか1種もしくは下記のもののいずれかの組み合わせが含まれる：1種以上のC3b(i)抗体、1種以上の癌抗原に免疫特異的な1種以上の抗体、1種以上のウイルス抗原に免疫特異的な1種以上の抗体、1種以上の微生物抗原に免疫特異的な1種以上の抗体、1種以上の補体成分、1種以上のC3b(i)抗体をコードする核酸配列、1種以上の癌細胞抗原に免疫特異的な1種以上の抗体をコードする核酸配列、1種以上のウイルス抗原に免疫特異的な1種以上の抗体をコードする核酸配列、1種以上の補体成分をコードする核酸配列、1種以上の微生物抗原をコードする核酸、リポ多糖、エンドトキシン、もしくはその他のグラム陰性細菌の外壁の構成物に免疫特異的な1種以上の抗体、および／またはリポ多糖、エンドトキシン、もしくはその他のグラム陰性細菌の外壁の構成物に免疫特異的な1種以上の抗体をコードする核酸。好ましい1態様において

は、本発明の組成物は実質的に精製されたものである(例えば、その組成物の作用を制限するような物質を実質的に含まない、もしくは望ましくない副作用を起こさないものである)。

【０１５７】

種々の送達システムが知られており、本発明の組成物を投与するために用いることができるが、そのようなシステムとしては例えば、リポソーム、マイクロパーティクル、マイクロカプセル、該化合物を発現することのできる組換え細胞、レセプターが介在するエンドサイトーシス(例えば、WuとWu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照されたい)、レトロウイルス性のまたはその他のベクターの一部としての核酸の構築等が含まれる。導入する方法としては、限定するものではないが、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、経鼻、硬膜外、および経口経路が含まれる。該組成物は都合のよい経路であればそのいずれによっても投与することができ、例えば、点滴もしくはボーラス注射、上皮もしくは粘膜皮膚の内膜を介した吸収(例えば、口腔粘膜、直腸および腸粘膜等)によって投与することができ、他の生物学的活性剤とともに投与することができる。投与は全身または局所的に行うことができる。さらに、本発明の組成物を任意の適切な経路によって中枢神経系へ導入することが望ましいであろうが、そのような経路としては、心室およびくも膜下投与がふくまれる；心室内投与は心室内カテーテルによって容易に行うことができ、それは例えば、オンマイヤリザーバーなどのリザーバーに付着させて行う。肺への投与も、例えば、吸入器もしくはネブライザーを用いて、およびエアロゾル化剤と製剤化して行うことができる。

【０１５８】

特別な実施形態においては、本発明の組成物を治療の必要な領域に局所的に投与することが望ましいであろう；これは、例えば、限定するものではないが、手術中の局所への輸注、局所適用、例えば手術後の創傷被覆剤とともに、注射で、カテーテルを用いて、坐剤で、または移植片を用いて行われ、その移植片は有孔のもの、無孔のもの、もしくはゼラチン状の材料であり、それにはsialastic膜などの膜、または線維であってよい。

【０１５９】

別の実施形態においては、該組成物は小胞、特にリポソーム中に入れて送達することができる(Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Treatら, 「感染症と癌の治療におけるリポソーム」"Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer", Lopez-BersteinとFidler(編), Liss New York, pp.353-365(1989); Lopez-Berestein, 同上文献, pp.317-327; 総説として上記の文献を参照されたい)。

【０１６０】

別の実施形態においては、該組成物は放出制御システムまたは徐放性システムで送達することができる。１つの実施形態においては、ポンプを用いることができる(Langer, 上述の文献; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwardら, 1980, Surgery 88:507; Saudekら, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574を参照されたい)。別の実施形態においては、ポリマー性の材料を放出制御システムに用いることができる(「放出制御の医学的応用」"Medical Applications of Controlled Release", LangerとWise(編), CRC Pres., Boca Raton, Florida(1974); Controlled Drug Bioavailability, drug Product Design and Performance, SmolenとBall(編), Wiley, New York(1984); RangerとPeppas, J., 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61を参照されたい; また、Levyら, 1985, Science 228:190; Duringら, 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howardら, 1989, J. Neurosurg. 71:105をも参照されたい)。また別の実施形態においては、放出制御システムは治療の標的の近傍におくことができ(例えば、脳、腎臓、胃、膵臓、および肺)、したがって全身投与時の投与量のごく一部しか必要としない(例えば、Goodson, Medical Application of Controlled Release中の記載, 上述の文献, 第2巻, pp.115-138(1984)を参照されたい)。その他の放出制御システムについてはLangerの総説(1990, Science 249:1527-1533)中に述べられている。

【０１６１】

本発明の組成物がタンパク質をコードする核酸であるような特別な実施形態においては、その核酸は適切な核酸発現ベクターの一部として構築されてそれが細胞内部にはいるように、例えばレトロウイルスベクターを用いることによって(米国特許第4,980,286号を参照されたい)、または直接注射によって、またはマイクロパーティクルガンを用いて(例えば、遺伝子銃; Biolistic, Dupont)、または脂質、もしくは細胞表面レセプターもしくはトランスフェクト剤でコーティングして、またはその核酸を核に入り込むことが知られているホメオボックス様ペプチドに連結させて投与することによって(例えば、Joliotら, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868)等によって投与されて、その核酸のコードするタンパク質の発現を促進するためにin vivoに投与することができる。あるいはまた、核酸を細胞内に導入して、発現のために相同組換えによって宿主細胞DNA中に組み入れることができる。

【０１６２】

本発明はまた、医薬組成物をも提供する。そのような組成物は、1種以上の抗C3b(i)抗体、1種以上の癌抗原に対して免疫特異的な1種以上の抗体、1種以上のウイルス抗原に対して免疫特異的な1種以上の抗体、1種以上の微生物抗原に対して免疫特異的な1種以上の抗体、1種以上の補体成分、またはそれらの組み合わせの予防上もしくは治療上有効な量、および製薬上許容される担体を含んでなる。特別な実施形態においては、「製薬上許容される」という用語は、米国のレン歩政府もしくは州政府の規制当局によって承認されているもの、または米国薬局方もしくはその他の一般的に認知されている動物、とりわけヒト用の薬局方に記載されているものを意味する。「担体」という用語はその治療剤とともに投与される溶剤、アジュバント、添加剤、もしくは基剤を意味する。そのような医薬品用担体は無菌の液体とすることができ、それは例えば、水および油などであり、その油には石油、動物、植物、もしくは合成の油が含まれ、例えば、落花生油、大豆油、鉱物油、ごま油等である。水は、該医薬組成物が静脈内に投与される場合には好ましい担体である。食塩溶液およびブドウ糖溶液、およびグリセロール溶液も液体担体として、特に注射溶液に用いることができる。医薬品用の添加剤で適切なものとしては、デンプン、ブドウ糖、乳糖、ショ糖、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、石灰、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥脱脂粉乳、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノール等が含まれる。該組成物には、所望により、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含有させることができる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、乳液、錠剤、丸剤、カプセル剤、粉末剤、徐放性製剤等の形態とすることができる。該組成物は、トリグリセリドなどの伝統的な結合剤および担体を用いて坐剤として製剤化することができる。経口の製剤中には医薬グレードのマンニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等の標準的な担体を含めることができる。適切な医薬品用担体の例は、E.W. Martinによる"Remington's Pharmaceutical Sciences"中に述べられている。そのような組成物には、該化合物の治療上有効な量を、好ましくは精製された形で、適切な量の担体とともに含み、患者への適切な投与のための形態が提供されることとなる。剤型は投与方法に適合したものでなければならない。

【０１６３】

好ましい実施形態においては、該組成物はヒトへの静脈内投与に適応させた医薬組成物を製する際に日常的に行われる方法で製剤化される。典型的には、静脈注射用の医薬組成物は無菌の等張水性バッファー中の溶液である。必要に応じて、該医薬組成物には可溶化剤および注射部位の痛みを軽減するためのリドカインなどの局所麻酔剤を含有させることもできる。通常は、その医薬組成物の成分は別々に、または一緒に混合されてユニット投与形態で、例えば、凍結乾燥粉末として、または無水の濃縮物として、アンプルもしくはサシェットなどの密封容器中に、活性成分の量を表示して、供給される。該組成物が点滴によって投与される場合には、その組成物を無菌の医薬グレードの水または食塩水を含有する点滴瓶に入れることができる。該組成物が注射によって投与される場合には、無菌の注射用水、または食塩水のアンプルが提供されて成分が投与前に混合することができる。

【０１６４】
本発明の医薬組成物は中性の形または塩の形で製剤化することができる。製薬上許容される塩としては、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等に由来する陰イオンと形成される塩、ならびにナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等に由来する陽イオンと形成される塩が含まれる。
【０１６５】
癌、ウイルス感染、または微生物感染の治療または予防に有効な本発明の組成物の量は、標準的な臨床の技術を用いて決定することができる。さらに、in vitroアッセイ法を任意で最適な投与量の範囲を求めるための補助として用いることができる。該製剤内で用いられる正確な投与量は、投与経路、および疾患または障害の重篤度によって変わり、担当医師の判断および各患者の状況に従って決定されるべきである。しかし、静脈内投与では適切な投与量範囲は通常は体重1kgあたり活性化合物約20～500mgである。経鼻投与では適切な投与量範囲は、通常は0.01 pg/kg体重～1mg/kg体重である。有効投与量は、in vitroの、または動物モデルでの試験システムから得られた用量反応曲線を外挿して得ることができる。
【０１６６】
坐剤は、通常は活性成分を重量比で0.5%～10%含有し；経口製剤は好ましくは活性成分を10%～95%含有する。
【０１６７】
抗体については、好ましい投与量は0.1mg/kg体重～100mg/kg体重(通常は10mg/kg～20mg/kg)である。該抗体が脳で作用する場合には、通常は50mg/kg～100mg/kgの投与量が適切である。一般的には、部分的にヒト由来である抗体と完全にヒト由来である抗体は他の抗体よりもヒトの体内での半減期が長い。従って、より低い投与量でより少ない投与回数が可能なことが多い。抗体の安定化、ならびに取り込みおよび組織への浸透(例えば、脳内へ)を増大させるために、脂質付加などの改変を行うことができる。抗体への脂質付加の方法はCruikshankら，1997，J. Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology 14:193に述べられている。
【０１６８】
本発明はまた、本発明の医薬組成物の1種以上の成分を充填した、1つ以上の容器を含んでなる医薬品パックまたはキットをも提供する。そのような容器には任意で、医薬品または生物学的製剤の製造、使用、もしくは販売を規制している政府当局によって定められたフォームの告知書を添付することができ、その告知書はその製剤のヒトへの投与のための製造、使用、もしくは販売についてのその当局の承認を反映したものである。
【０１６９】
5.10. 癌の診断と造影
C3b(i)と特異的に結合する標識抗体、その誘導体、および類縁体は癌の検出、診断、もしくはモニターという診断目的で用いることができる。好ましい実施形態においては、IgGもしくはIgM抗体と共有結合で結合したC3b(i)、または癌細胞に共有結合で結合したC3b(i)に免疫特異的に結合する抗C3b(i)抗体が、癌の検出、診断、もしくはモニターのために診断用途に用いられる。好ましい実施形態においては癌は患者の体内で検出される。その患者は動物、好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトである。
【０１７０】
１つの実施形態においては、診断は次のことによって行われる：a)C3b(i)または第2の分子に共有結合で連結させたC3b(i)に免疫特異的に結合する標識分子の有効量を動物に投与し；b)投与後、その動物の体内の癌性の部位の全てに標識分子が優先的に濃縮される(および結合しなかった標識分子が排除されてバックグラウンドのレベルに戻る)ように時間をおき；c)バックグラウンドのレベルを測定し；ならびにd)被験者体内の標識分子を検出し、バックグラウンドレベルを超える標識分子が検出されれば癌の存在が示される。１つの実施形態においては、診断は次のことによって行われる：a)癌細胞抗原に免疫特異的に

結合するIgG抗体、IgM抗体、血漿、1種以上の補体成分、および/または1種以上の抗体の投与に先立って、同時に、またはその後に、C3b(i)または第2の分子に共有結合で連結させたC3b(i)に免疫特異的に結合する標識分子の有効量を動物に投与し；b)投与後、その動物の体内の癌性の部位の全てに標識分子が優先的に濃縮される(および結合しなかった標識分子が排除されてバックグラウンドのレベルに戻る)ように時間をおき；c)バックグラウンドのレベルを測定し；ならびにd)被験者体内の標識分子を検出して、バックグラウンドレベルを超える標識分子が検出されれば癌の存在が示される。バックグラウンドレベルは種々の方法で測定することができ、そのような方法としては、検出された標識分子の量をある特定の系についてあらかじめ測定しておいた標準値と比較する方法が挙げられる。

【０１７１】

本発明は動物の癌の診断または検出のための方法を提供し、その方法は、該動物にC3b(i)または第2の分子に共有結合で連結させたC3b(i)に免疫特異的に結合する標識抗体の有効量を投与後ある時間をおいてその動物を造影し、その時間とは標識抗体が該動物の体内の癌性の部位の全てに優先的に濃縮されるために十分な時間であり、被験者体内の部位に局在化した標識抗体が検出されることが癌の存在を示すことを含んでなるものである。本発明はまた、動物体内の癌の診断または検出のための方法を提供し、その方法は、該動物にC3b(i)または第2の分子に共有結合で連結させたC3b(i)に免疫特異的に結合する標識分子の有効量の動物への投与を、癌細胞抗原に免疫特異的に結合するIgG抗体、IgM抗体、血漿、1種以上の補体成分、および/または1種以上の抗体の投与に先立って、同時に、またはその後に行い、その後ある時間をおいてその動物を造影し、その時間とは標識抗体が該動物の体内の癌性の部位の全てに優先的に濃縮されるために十分な時間であり、被験者体内の部位に局在化した標識抗体が検出されることが癌の存在を示すことを含んでなるものである。

【０１７２】

投与後その被験者の体内の癌性の部位の全てに標識分子が優先的に濃縮され、結合しなかった標識分子が排除されてバックグラウンドのレベルに戻るための時間は、用いられる標識のタイプおよび投与方法を含むいくつかの変動条件に依存するが、6～48時間、6～24時間、または6～12時間である。別の実施形態においては、その投与後の時間は、5～20日間、または5～10日間である。

【０１７３】

特別な実施形態においては、癌のモニタリングは癌の診断のための方法を、例えば、初回診断の1ヶ月後、初回診断の6ヶ月後、初回診断の1年後等の期間で繰り返すことによって行われる。

【０１７４】

本発明の別の特別な実施形態においては、腫瘍の密度が本発明での抗C3b(i)抗体を用いた腫瘍の検出を容易にする。

【０１７５】

米国特許出願No.60/181,143、2000年2月8日出願、この出願の特に第2ページは、本明細書中にその全体を参照として組み入れることとする。

【０１７６】

5.10.1. 検出と造影の方法

患者の体内の標識分子の存在は当該分野でin vivoスキャンニングのためのものとして知られている方法で検出することができる。これらの方法は用いている標識のタイプによって変わる。当業者であれば、ある特定の標識を検出するための適切な方法を決定することができよう。本発明の診断方法に用いることのできる方法と器具としては、限定するものではないが、次のものを含む：コンピューター断層造影法(CT)、陽電子放射造影法(PET)、核磁気共鳴造影法(MRI)、および音波検査法などの全身スキャン。

【０１７７】

特別な実施形態においては、該分子は放射性同位元素で標識され、放射性に応答する手術器具(Thurstonら，米国特許第5,441,050号)を用いて患者体内で検出される。別の実施形

態においては、該分子は蛍光化合物で標識され、患者の体内のその分子は蛍光に応答するスキャンニング装置で検出される。別の実施形態においては、該分子は陽電子放出金属で標識され、陽電子放射造影法により患者体内で検出される。また別の実施形態においては、該分子は常磁性物質で標識され、患者の体内のその分子は核磁気共鳴造影法(MRI)で検出される。

【０１７８】

5.11. キット

本発明はまた、上述の方法で用いることのできるキットをも提供する。１つの実施形態においては、キットは、C3b(i)または第2の分子に連結させた(例えば共有結合で連結させた)C3b(i)に免疫特異的な1種以上の抗体を、1つ以上の容器に含んでなる。別の実施形態においては、キットは、C3b(i)または第2の分子に連結させた(例えば共有結合で連結させた)C3b(i)に免疫特異的な1種以上の抗体とIgM抗体とを、1つ以上の容器に含んでなる。別の実施形態においては、キットは、C3b(i)または第2の分子に連結させた(例えば共有結合で連結させた)C3b(i)に免疫特異的な1種以上の抗体とIgG抗体とを、1つ以上の容器に含んでなる。別の実施形態においては、キットは、C3b(i)または第2の分子に連結させた(例えば共有結合で連結させた)C3b(i)に免疫特異的な1種以上の抗体と1種以上の補体成分とを、1つ以上の容器に含んでなる。別の実施形態においては、キットは、C3b(i)または第2の分子に連結させた(例えば共有結合で連結させた)C3b(i)に免疫特異的な1種以上の抗体と1種以上の癌細胞抗原、ウイルス抗原、または微生物抗原に対して免疫特異的な1種以上の抗体を、1つ以上の容器に含んでなる。別の実施形態においては、キットは、C3b(i)または第2の分子に連結させた(例えば共有結合で連結させた)C3b(i)に免疫特異的な1種以上の抗体、IgM抗体またはIgG抗体、および1種以上の補体成分を、1つ以上の容器に含んでなる。また別の実施形態においては、キットは、C3b(i)または第2の分子に連結させた(例えば共有結合で連結させた)C3b(i)に免疫特異的な1種以上の抗体、1種以上の癌細胞抗原、ウイルス抗原、または微生物抗原に対して免疫特異的な1種以上の抗体、および1種以上の補体成分を、1つ以上の容器に含んでなる。

【０１７９】

好ましくは、本発明のキットはさらに、C3b(i)または第2の分子に連結させた(例えば共有結合で連結させた)C3b(i)に免疫特異的でない対照の抗体を含んでなる。特別な実施形態においては、本発明のキットはC3b(i)に免疫特異的な抗体の標識されたものを含む。好ましい実施形態においては、本発明のキットはC3b(i)に免疫特異的な抗体の治療用剤とコンジュゲートされたものを含む。別の好ましい実施形態においては、本発明のキットはC3b(i)に特異的な抗体の診断用剤とコンジュゲートされたものを含む。また別の好ましい実施形態においては、本発明のキットはC3b(i)に免疫特異的な抗体の精製されたものを含む。また別の実施形態においては、本発明のキットは、IgG抗体もしくはIgM抗体と共有結合で結合したC3b(i)、または癌細胞、ウイルス、もしくは微生物と共有結合で結合したC3b(i)に対して免疫特異的に結合する抗C3b(i)抗体を含む。

【０１８０】

特定の実施形態においては、本発明のキットは、癌、ウイルス感染、または微生物感染の治療、予防、または診断のための該抗体の使用の説明書を含んでいる。

【実施例】

【０１８１】

6. 実施例：腫瘍特異的抗原としてのC3b(i)

次の実施例は前立腺腫瘍細胞のオプソニン化後にC3b(i)が腫瘍特異的抗原として機能することができることを示している。C3b(i)に特異的な抗体は、細胞毒剤、化学療法剤、免疫増強剤、放射性化合物、遺伝物質、および免疫エフェクター細胞を含む治療用剤または診断用剤の標的腫瘍細胞への送達に用いることができる。

【０１８２】

LNCaPおよびその細胞系統由来のC4-2ヒト前立腺癌細胞系統をこの実施例で用いて、免疫療法での標的としてのC3b(i)の使用を示した。LNCaP/C4-2進行性モデルは、ヒト前立腺の

新生物疾患のアンドロゲン応答性で転移のほとんどないもの(LNCaP細胞)からアンドロゲン治療抵抗性(去勢した宿主で増殖しうるものと定義される)で高度に進行性の表現型(C4-2サブライン)のものへの進行を再現する(Thalmannら, 1994, Canc. Res. 54:2577-81; Chungら, 1996, Urol. Oncol. 2:99-128; Hyytinenら, 1997, Br. J. Cane. 75:190-5)。このモデルは臨床で見られるヒト前立腺癌とその遺伝子型および表現型の変化について非常に著しい類似性を有している。さらに、LNCaP/C4-2進行性モデルは、in vitroおよびin vivoの双方で抗前立腺癌の治療アプローチを評価するため、特にホルモン治療抵抗性の前立腺癌については現在のところ有効で耐容性のよい治療法がほとんどないので(Scherら, 1994, Sem. Oncol. 21:630-56)、強力な道具であることが示されている(Chungら, 1997, Acta Urol. Jap. 43:815-20)。

【０１８３】

6.1. 材料と方法

細胞系統と血清検体

LNCaP(American Type Culture Collection, Rockville, MD)およびC4-2(Urocor, Oklahoma City, OK)ヒト前立腺癌細胞系統は5%の加熱によって不活化したウシ胎児血清(FBS; Gibco, Grand Island, NY)を添加したT-培地中で維持した。培養液は加湿した5%$CO_2$中で37℃で維持し、分割し、80%から90%コンフルエンスになるまで培養し、可能であれば25%コンフルエンスで処理した。細胞を、2.5mMエチレンジニトリロ四酢酸(EDTA; Sigma, St Louis, MO)を含むリン酸緩衝食塩液(PBS)、またはリン酸緩衝食塩液(PBS)中に1:10で希釈したトリプシン(Gibco, Grand Island, NY)のいずれかを用いて採取した。サンプルを450gで2分間遠心してPBSで2回洗い、1%ウシ血清アルブミンを添加したPBS(BSA-PBS)中に細胞が0.2～1 x $10^7$個/mLの最終濃度となるように再懸濁した。

【０１８４】

血清サンプルは書面によるインフォームドコンセントを得た上で正常男性および女性のボランティア(University of Virginia, Charlottesville, VA)から、および前立腺疾患で経過観察されている男性(University of VirginiaおよびEastern Virginia Medical School, Norfolk, VA)から得た。前立腺疾患患者は良性または悪性の前立腺疾患のいずれかの病理所見のある患者とした。血液はSSTゲルおよび凝固活性化剤Vacutainerの入った試験管(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)中に採取して、30分間室温で保持し、次いで20分間700 X gで遠心して血清を得て、それを－80℃で保存した。

【０１８５】

腫瘍細胞の血清によるオプソニン化

採取したLNCaPおよびC4-2腫瘍細胞(BSA-PBS中に1 X $10^7$個/mL)を同量の新たに融解させた血清と混合し、37℃で20分間緩徐に振盪した。オプソニン化された細胞を2回洗い、最終濃度をBSA/PBS中1 X $10^7$個/mLとした。別のオプソニン化方法は、血清に10mM EDTAを添加して補体の活性化を全てブロックし(またはEDTA含有の血漿を用いて)、10mM エチレングリコール四酢酸(EGTA)および5mM Mg(MgEGTA)を添加して第二経路のみが活性化されるようにし、精製IgM(1mg/mL, Sigma, St. Louis, MO)、またはIgMを減少させた血清を使用する。この場合には、IgMは、2.5mLの血清を1.65mL(固定量)の抗ヒトIgMアガロース(Sigma, St. Louis, MO)と氷上で1時間、緩徐に振盪しつつインキュベートすることによって正常ヒト血清(NHS)からIgMを除去した。この除去した血清は1600 X gで遠心することによってアガロースから分離して－80℃で保存した。ELISAの測定(ここには示していない)ではこの方法によって血清からヒトIgMの＜90%が特異的に除去されたがヒトIgGのレベルの減少は10%未満であったことが示された。

【０１８６】

モノクローナル抗体

C3b(i)に特異的な$IgG_1$ mAbである7C12、2H11、および8E11；ヒトIgMに特異的な$IgG_1$ mAbであるHB57；ヒト補体レセプター1(CR1)に特異的なIgG2a mAbである7G9については既に報告されており(Fergusonら, 1995, Arthritis Rheum 38:190; Taylorら, 1989, J. Immunol. 143:3626; およびTosicら, 1989, J. Immunol. Methods 120:241)、アイソタイプをマ

ッチさせた対照と並行して用いた。抗C3b(i)mAb 3E7($IgG_1$)、これは異なるエピトープと結合し他の抗C3b(i)mAbではブロックされないが、これを我々が既に報告した方法で調製した(Tosicら, 1989, J. Immunol. Methods 120:241)。C3b(i)に対するmAb 3E7の特異性は、間接フローサイトメトリーで確認したが、それは次のとおり行った。フルオレセイン-イソチオシアナート(FITC)標識抗マウスIgGで調べると、mAb 3E7と7C12の双方とも、血清でオプソニン化したブタ赤血球に結合した。 5μg/mLの精製、加熱処理(56℃)C3(Quidel, San Diego, CA)の存在下では、mAbのオプソニン化ブタ赤血球への結合はそれぞれ88%および62%減少した(結果はここには示していない)。mAbの$^{125}$Iでの放射性標識をIodogen法で行った(Edbergら, 1988, J. Immunol. 141:4258; およびFrakerら, 1978, Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:849)。二重特異的mAb複合体(ヘテロ多量体)をmAb 3E7をmAb 7G9と架橋させることによって調製した(segalら, 1995, Curr. Protocol Immunol. 2:131; およびTaylorら, 1997, J. Immunol. 97:842)。

【０１８７】

腫瘍細胞の血清によるオプソニン化

採取したLNCaPおよびC4-2腫瘍細胞(BSA-PBS中に5 X $10^6$個/mL)を同量の新たに融解させた血清と混合し、37℃で20～30分間緩徐に振盪した。オプソニン化された細胞を2回洗い、最終濃度をBSA/PBS中で5 X $10^6$個/mLとした。別のオプソニン化方法として、血清に10mM EDTAを添加して、またはEDTA含有の血漿を用いて補体の活性化を全てブロックし、10mM [エチレンビス(オキソニトリロ)]-N,N,N',N'-四酢酸(EGTA)および5mM $Mg^{2+}$ (MgEGTA)を添加して第二経路のみが活性化されるようにし、精製IgM(1mg/mL, Sigma, St. Louis, MO)を用いたか、またはIgMを減少させた血清を用いた。後者の場合には、2.5mLの血清を1.65mL(固定量)の抗ヒトIgMを連結させたアガロース(Sigma, St. Louis, MO)と氷上で1時間、緩徐に振盪しつつインキュベートすることによってNHSからIgMを除去した。この除去した血清は1600 X gで遠心することによってアガロースから分離して－80℃で保存した。ELISAの測定(ここには示していない)ではこの方法によって血清から90%を超えるヒトIgMが特異的に除去されたがヒトIgGのレベルの現象は10%未満であったことが示された。

【０１８８】

フローサイトメトリーおよびラジオイムノアッセイ

オプソニン化した癌細胞を、まずFITC標識ヤギ抗-(ヒトIgM)Fc5μ(Pierce, Rockford, Il)、FITC標識ヤギ抗ヒトIgG Fc(Accurate, Wesbury, N.Y.)、または抗C3b(i)mAb 7C12と8E11の混合物(典型的には各200ng mAb/$10^6$個の細胞)で、次いで二次FITC標識ヤギ抗マウスIgG(Sigma, St. Louis, MO)で探索した。インキュベーションは全てBSA-PBS中で37℃で20分間行った。対照としては、オプソニン化していない細胞、および関連のないアイソタイプが適合するmAbを用いた。場合によっては、細胞をヨウ化プロピジウム(Sigma, St. Louis, MO)をBSA-PBS中最終濃度2μg/mLとしたものを用いて5分間、暗所、氷上で染色して生細胞集団のみがIgMまたはC3bオプソニン化されていることを確認した。生存率は通常は約75%であった。1色または2色蛍光分析をFACSCaliburフローサイトメーター(Beckton Dickinson, San Jose, CA)でCellQuestソフトウェアを用いて行った。

【０１８９】

$^{125}$I標識抗C3b(i)および抗ヒトIgM mAbの癌細胞への結合の研究は以前に公表された方法(Edbergら, 1988, J. Immunol. 141:4258; およびTaylorら, 1989, J. Immunol. 143:3626)に従って行った。簡潔に述べれば、オプソニン化後、5 x $10^6$個の癌細胞を$^{125}$I標識mAb 7C12、8E11、3E7、もしくはHB57(最終濃度は0.1μg/mLと10μg/mLの間)、またはアイソタイプが適合する対照と20～30分間インキュベートした。バックグラウンドでの結合を調べるための別の対照として、無処置の癌細胞を$^{125}$I標識mAbとインキュベートした。mAbの癌細胞への結合のレベルはサンプルを油で遠心分離し細胞ペレット中の放射性カウントを測定することによって求めた(Rossら, 1985, J. Immunol. 135:2005)。あるいはまた、抗C3b(i)mAbが補体オプソニン化の間に癌細胞と結合しうるか調べるために、$^{125}$I標識mAb 3E7または7C12を、癌細胞とNHSを含有するインキュベーション混液中に直接添加した。37℃でインキュベーションした後、細胞を油で遠心分離してmAbの結合を測定した。

【０１９０】
ロゼット実験
BSA/PBSまたは血漿中のいずれかに懸濁させたヒト赤血球(約5 x $10^7$個)の50%懸濁液の10μLのサンプルを2 x $10^4$個のLNCaP細胞(オプソニン化していないもの、または上述のとおり血清でオプソニン化したもの)と、20ngの抗CR1 x 抗C3b(i)(7G9 x 3E7)ヘテロ多量体の存在下または不在下でインキュベートした。37℃で30分間インキュベートした後、細胞混合物をBSA-PBS中に最終濃度が1%の赤血球となるように再懸濁した。光学顕微鏡を用いて赤血球/腫瘍細胞ロゼット形成の存在と程度を評価した。
【０１９１】
免疫組織化学
病理組織学的に明確に判定済みのパラフィン包埋組織切片を3%過酸化水素でパラフィン除去し、Super Block(Scytek Laboratories, Logan, Utah)でブロックし、次いでAvidin/Biotin Block(Vector Laboratories Inc., Burlingame, Calif.)で処理した。固定した切片を4μg/mLの抗C3b(i)$IgG_1$ mAb 7C12および8E11と4℃で一晩インキュベートした後、ビオチニル化ヤギ抗マウスIgGおよびペルオキシダーゼをコンジュゲートしたストレプトアビジン(Biogenex Laboratories, San Ramon, CA)とともにインキュベートした。次いで、ペルオキシダーゼの基質として3-アミノ-9-エチルカルバゾール/$H_2O_2$を用いた。マウス$IgG_1$を染色の陰性対照として用いた。免疫組織化学的染色の存在と程度は光学顕微鏡で評価した。
【０１９２】
癌細胞の磁気パージング(Magnetic Purging)：ラジオイムノアッセイ(RIA)による分析
抗C3b(i)mAb 2H1I(これはmAb 7C12が結合するエピトープと同じものを認識する(Tosicら, 1989, J. Immunol. Methods 120:241))またはmAb 3E7をアミンを末端に持つBioMag粒子(Polyscience Inc., Warrington, PA)と製造者の使用説明書に従って共有結合で結合させた。癌細胞は$^{51}$Crで標識し(Fergusonら, 1995, Arthritis Rheum. 38:190)、等量のNHSでオプソニン化し、3回洗った後、磁気パージングプロトコール(下記参照)にかけた。血清中での血液細胞を用いた実験のため、血液をEDTA中に採取し、細胞を3回洗い、血清中に再構成し(または血漿/EDTA中に対照として再構成し)、その後$^{51}$Cr標識癌細胞を添加した。あるいはまた、いくつかの実験では、$^{51}$Cr標識癌細胞(約50,000個の細胞)をまず最初に抗凝固剤としてEDTA(補体活性化は防止される)、またはクエン酸塩(補体活性化は部分的に可能である)を用いた全血のアリコートと混合した。オプソニン化した後、サンプルを3回洗った。全てのオプソニン化法で80%を超える$^{51}$Cr標識が癌細胞で保持された。
【０１９３】
オプソニン化ステップ後に5 x $10^4$個の癌細胞（約50,000cpmに相当する）を含有する25μLを、約100μgの抗C3b(i)mAb、または対照の関連のないIgG抗体(ヤギ抗マウスIgGもしくはヒツジ抗FITC)を含有する100μLのBioMag粒子とインキュベートした。氷上で30分間インキュベーションした後、その混合物をPolyscience BioMag 15mL分離ユニット中に置き、7mLのBSA/PBSを添加して分離した(結合していない)上清の量を増加させた。この分離工程をさらに2回繰り返した。磁気粒子に結合した物質の$^{51}$Crをカウントし、ビーズに結合したインタクトなさい棒の比率を計算するために、遠心工程の後、結合していない上清(インタクトだが結合していない細胞)からペレット化した物質を$^{51}$Crでカウントした。細胞に会合した$^{51}$Crの当初のインプットレベルの約90～95%がペレット化した上清中に存在するか、または粒子に直接的に結合していることが確認された。
【０１９４】
パージングの正常細胞に与える影響：フローサイトメトリーによる分析
パージングの正常細胞に与える影響を調べるために、全血のアリコートおよび血清中に再構成した血液細胞について、オプソニン化、洗浄、およびBioMag粒子との反応を含む同じ工程で実験した。これらの実験では、フローサイトメーターの放射能による汚染の可能性を避けるためにこのアリコートは$^{51}$Cr標識癌細胞とは混合しなかった。全血サンプルを処理した後、多数の標準マーカー(下記参照)とともにフローサイトメトリーでアッセイした

。最後に、我々は、University of Virginiaの癌患者の白血球分離採血(leukopheresis)でCD34陽性細胞に富む血液サンプルを得たが、その患者は自家幹細胞移植の準備として顆粒球コロニー刺激因子での治療を受けていた患者であった。それらのサンプルを正常人から得た血液型が適合する全血(クエン酸塩またはEDTAを含有)中に希釈するか、または血清で再構成した洗浄血液細胞に添加し、同じオプソニン化およびパージングプロトコールにかけた。

【０１９５】

パージング後に、結合していない細胞性のフラクションを再構成して出発時の容量として、現像試薬使用のための製造者の使用説明書に従ってフローサイトメトリーで調べた。CD3/CD4陽性リンパ球およびCD3/CD8陽性リンパ球を分析するためにBecton Dickinson Multitest試薬(CN340499、CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCp/CD4 APC)を用いた。CD45陽性細胞の光散乱プロフィールを同じ実験で顆粒球をカウントするために用いた。別の実験では、CD34陽性細胞をCD45(PerCp, BD347474)およびCD34(APC, BD 340441, アイソタイプ対照BD 340442)のデュアルゲーティングによって測定した。CD14陽性細胞はCD45とCD14(FITC, Caltag, Burlingame, Calif., MHCDI401, アイソタイプ対照MG2a01)のデュアルゲーティングで同定した。これらの測定ではFluorCount Fluorospheres(Coulter, Miami, Fla, PN2547053)をサンプル液量を標準化するために用いた。

【０１９６】

放射免疫療法の細胞毒性研究

$^{131}$I標識抗C3b(i)(7C12および8E11)mAbのLNCaPおよびC4-2前立腺癌細胞系統に対する細胞毒作用を下記にしたがって評価した。前立腺癌細胞系統の各々の1 x $10^6$この細胞を25% NHS(BSA-PBS中に希釈)でオプソニン化するか、またはBSA-PBS中で37℃30分間保持した。PBSで2回洗った後、$^{131}$I標識7C12＋8E11の2μgもしくは200ng、または$^{131}$I標識した関連のないmAb(BSA-PBS中に希釈)のいずれかを細胞の各セットに添加し、室温で30分間インキュベートした。細胞をPBSで2回洗い、T-培地＋5% FBS中の24ウエルの組織培養プレートに3回重複させて1ウエルあたり3 X $10^6$個蒔いた。プレートを37℃で5% $CO_2$加湿環境下においた。3日目に1回培地の交換を行った。mAb処理後24時間目から開始して、5日目(LNCaP)および6日目(C4-2)に、3回重複して蒔いたウエルから細胞を採取して細胞の殺滅を、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-いる)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(MTT)(Sigma, St. Louis, MO)アッセイ結果での相異と比較して評価した。

【０１９７】

6.2. 結果

C3b(i)およびIgMは前立腺癌細胞上に沈着する

正常ヒト血清(NHS)を用いたC4-2前立腺癌細胞(およびLNCaP、下記参照)のオプソニン化によってその細胞上へのC3b(i)の大量の沈着がもたらされた。フローサイトメトリー実験の代表的なものを図１に示したが、NHSによるC3b(i)オプソニン化のC4-2細胞に及ぼす効果は上部パネルに示している(図１A)。同様な結果が他の8名の正常人から得た血清で得られた(データはここには示していない)。C3b(i)の沈着は古典的経路および第二経路の双方の活性化によって促進されるものと考えられるが、Mg-EGTA（第二経路の活性化のみ可能）を血清に添加した場合には、C3b(i)の沈着量はかなり少ないことが示される。さらに、NHSでのオプソニン化は、この癌細胞に特異的なIgMのソースを提供する(図１B)。補体活性化の古典的経路をブロックする条件下(Mg-EGTA)で実験を行うと、IgMはより容易に癌細胞上に認められるが、それは古典的経路を介するC3bの沈着がIgM上のエピトープを部分的にブロックするためと考えられる(下記の表Iを参照されたい)。このフローサイトメトリーの結果は、前立腺癌患者から得た血清を用いてオプソニン化した後には腫瘍細胞上へのC3b(i)およびIgMの沈着は著しく少ないことをも示している(図１C、D)。しかし、第二経路(Mg-EGTA処理血清)を介するC3b(i)の沈着が正常血清および癌患者血清の双方で同等であることは注目されることであり、このことは前立腺癌患者から得た血清中でも補体活性化の第二経路が無傷であることを示唆している。

【０１９８】

IgMの結合は癌細胞のC3b(i)を用いた強固なオプソニン化を促進する

抗体が介在する補体活性化の機作についての古典的な研究に基づいて(Borsosら, 1965, Science 150:505; Circoloら, 1985, Mol. Immunol. 22:207; およびSchneiderら, 1972, J. Clin. Invest. 51:583)、このような癌細胞上で観察された補体活性化はそれらの細胞への血清IgMの結合によって主として促進されるとの仮説が立てられた。IgMの作用を単独で調べるために、血清の補体活性を保存する条件下でNHSから血清IgMを除去するためのアフィニティークロマトグラフィーを用いることができる。RIAおよびフローサイトメトリーの双方で、LNCaPまたはC4-2細胞をオプソニン化するためにIgMを減少させた血清を用いると、癌細胞上のC3b(i)の沈着は著しく減少することが示された(図２)。しかし癌細胞をまず最初に、古典的経路と第二経路の双方をブロックするEDTAを含有する正常ヒト血漿(全血漿)とインキュベートしておくと、正常なC3b(i)沈着レベルに回復する。従って、インタクトな血漿は、癌細胞を洗浄後、IgMを減少させた血清、それは補体のソースとなるものであるが、そのような血清と反応させた後のその癌細胞上へのC3b(i)の強固な沈着を起こすのに十分な量のヒトIgMのソースを提供する。RIA分析ではさらに、癌細胞を精製IgMで処理した後、IgM減少血清を補体ソースとして処理することによって、癌細胞上へのC3b(i)の沈着が増強されることが確認される(図２B)。

【０１９９】

次に、抗C3b(i)mAbの標的となりうる、血清でオプソニン化された癌細胞上の利用可能なエピトープの数を測定した。NHSでオプソニン化した後に細胞上に作られたC3b(i)部位の数を評価するために、用量反応研究をいくつかの条件下で行った。図３に示した結果は、補体の活性化によって、バックグラウンド補正後の値で細胞1個あたり100,000個を超えるC3b(i)エピトープが産生されうることを示している。多量のC3bおよびその分解産物が、免疫複合体による補体活性化の間に、その免疫複合体が細胞表面または微粒子上にあっても、溶液中に三星されることはよく知られており(Circoloら, 1984, Mol. Immunol. 21:191; Edbergら, 1988, J. Immunol. 141:4258; およびGaddら, 1981, Biochem. J. 195:471)、抗C3b(i)mAbの正確な特異性の如何にもよるが、これらのフラグメントが抗C3b(i)mAbへの結合に競合しうると予測することは合理的であろう。実際、大多数の実験では125I標識mAb 7C12の結合は、そのmAbがオプソニン化工程中存在しているときには、バックグラウンドのレベル(実験誤差の範囲内)まで低減した。例えば、結合した放射能(結合した分子を計算するために用いられる)は、洗浄した細胞に3μg/mLのmAb 7C12が添加されると6,700±100cpmであり；対応する「オプソニン化中存在」しているプロトコールでの値は90±100 cpmであった。バックグラウンド値(オプソニン化なし)は900±100cpmであった。しかし、$^{125}$I標識mAb 3E7はオプソニン化工程中存在しているときでも依然として癌細胞に結合することができる。さらに、ある場合では、インプットの濃度が高いと(図３B; 10μg/mL)、このmAbは癌細胞上のC3bフラグメントの最終的な沈着を増大させるものと考えられる。精製加熱処理したC3を用いた阻害研究(材料と方法を参照されたい)により、mAb 3E7のC3b(i)に対する特異性が確認された。これらの知見はmAb 3E7がオプソニン化された癌細胞上に位置するC3b(i)に優先的に結合し、培地中のC3b(i)フラグメントによる阻害に対してはmAb 7C12よりも影響を受けにくいことを示している。

【０２００】

表１：2名の別々の正常ドナーから得た血清によるC4-2細胞上へのC3b(i)の沈着は、フローサイトメトリーおよびラジオイムノアッセイの双方によるヒトIgMの検出

【表１】

| 処理法 | 蛍光強度の対数の平均値* | | 結合した $^{125}$I-mAb の数 | |
|---|---|---|---|---|
| | 抗 C3b(i) | 抗ヒト IgM | 抗 C3b(i) mAb 8E11 (平均±SD) | 抗ヒト IgM mAb HB57 (平均±SD) |
| 血清なし | 7.5 | 4.7 | 1,200±270 | 850±30 |
| 血清 | 266 | 14.8 | 27,700± 70 | 3,100±60 |
| 血清＋EDTA | 9.1 | 36.8 | 880±100 | 7,900±30 |
| 血清＋MgEGTA | 55.6 | 29.3 | 12,000±50 | 7,300±330 |

* 図１に示したものと同じデータ。

【０２０１】
このデータは天然のヒトIgMが癌細胞上の表面抗原と結合して古典的経路の活性化を促進し、細胞上へのヒトC3b(i)の多量の沈着を起こすことを強く示唆している。しかし、補体活性化とC3b(i)沈着後、フローサイトメトリーとRIAでは比較的低いレベルの癌細胞結合IgMしか見出されない(図１および表１)。このことはおそらく、ひとたびC3b(i)が共有結合でIgMと結合すると、IgM分子上のエピトープはC3b(i)によって妨害され、それによってフローサイトメトリーとRIAに用いられる抗IgM抗体の結合が妨げられることによるものであろう。免疫複合体中のヒトIgM上へのC3bフラグメントの沈着はいくつか報告されている(Mehtaら, 1986, J. Immunol. 136:1765; Taylorら, 1989, J. Immunol. 143:3626; およびThorntonら, 1996, Clin. Exp.Immunol.104:531)。従って、いくつかのC3b(i)は癌細胞上のIgMと複合体を形成し、C3b(i)も共有結合で癌細胞上の糖タンパク質および糖脂質にも付着している可能性がある。

【０２０２】
図１の代表的なデータは、前立腺癌の男性から得た血清は癌細胞上へのC3b(i)の沈着においてNHSよりも効力が低いことを示している。これまでに行われたいくつかの研究では、癌細胞に結合することのできるIgMの量は癌患者の血清中では減少していることが示されている(Desaiら, 1995, J. Immunol. Methods 188:175; Dillman, R.O., 1994, J. Clin. Oncol. 12:1497; Grossら, 1988, Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 34:363; Higuchiら, 1980, J. Clin. Lab. Immunol. 4:141; およびSeegalら, 1976, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 52:205)。これらの知見を独立に確認するために、多数の正常人および前立腺癌の男性から血清を得て抗腫瘍性IgMのレベルの相異を調べた。実験は、癌細胞に結合するIgMの検出にあたってのC3b(i)が存在による混同しやすくブロックする影響を排除するため0.01M EDTA含有の血清を用いて行った。その結果は図４に示すが、3回の実験のうち2回で癌細胞に結合されたIgMのレベルは正常血清では前立腺癌患者の血清よりも有意に多かった。3回目の実験は有意差には至らなかったが、対照群のサンプル数が小さくなければ有意差が得られたかもしれない。1つの調査では、我々はIgMに加えて癌細胞に結合したIgGについてもアッセイした。図４に示すとおり、もしあったとしてもごくわずかなNHS中のIgGは癌細胞に結合している。しかし何例かの癌患者から得た血清は顕著な力価を示し、そのことは患者群での大きな標準偏差となって現れている。断定的な結論を引き出すには調査数が小さすぎるが、これらの結果は癌患者の何例かで活発な抗腫瘍免疫応答が起こっている可能性を示唆している。癌患者で腫瘍特異的IgGの上昇がみられることは既に報告されている(Vetvickaら, 1997, J. Immunol. 159:599)。

【０２０３】
C3b(i)の沈着は腫瘍細胞特異的である
C3b(i)エピトープの癌組織特異性を調べるために、抗C3b(i)mAbを結合させた前立腺組織検体の凍結切片を免疫組織化学的に染色した。良性の前立腺肥大で経尿道的切除術を受けた2例の男性からの手術時に採取した検体を対照として用いた。対照ではどちらも抗C3b(i)mAbの結合は免疫組織化学的には認められなかった(図５A)。これに対して、前立腺癌の

男性から得た30検体のうち、8検体(61%)が抗C3b(i)mAb陽性の染色を示した(図５B)。さらに、これらの8検体では、悪性腫瘍の領域のみが染色され、良性細胞が優勢である領域では陰性のままであった。非常に強い染色を示したのは2検体のみで、このことは、補体は前立腺癌細胞上に沈着はするが、本来の宿主補体の沈着はそれ自体では、オプソニン化は最適なレベルを下回るものしか提供できず、正常ドナーからのIgMの全身的輸注(血漿の形での)は有益なものとなることを示す。

【０２０４】

特異的抗CR1 x 抗C3b(i)ヘテロ多量体の存在下におけるオプソニン化腫瘍細胞による赤血球ロゼット

癌の免疫療法で現在行われているmAbの適用の1つは、癌細胞抗原に特異的なmAbをエフェクター部位(例えば、単球/マクロファージ、顆粒球、またはナチュラルキラー細胞上のFcレセプター)に特異的なmAbと架橋させた二重特異的試薬を作製することである(Rennerら, 1995, Immunol. Rev. 145:179; およびSegal DM, Bakacs T, Jost CR, KuruezI, Sconocchia G, Titus JA(1995) 「T細胞による標的を定めた細胞傷害性」"T-cell targeted cytotoxicity", Fanger MW(編)「二重特異性抗体」"Bispecific antibodies"中の記載、Landis, Austin, Tex, p27-42)。このアプローチでは、免疫担当細胞は抗腫瘍mAbのガイダンスを介して直接的に、特異的に腫瘍へと送達させることができる。このアプローチの試作版を、C3b(i)および霊長類の赤血球補体レセプター(CR1)に対して特異的な二重特異的mAb複合体(ヘテロ多量体)によって、ヒト赤血球がC3b(i)でオプソニン化された癌細胞に結合しうるかを試験することによって評価した。図６に示すとおり、オプソニン化された腫瘍細胞に完全に取り囲まれた赤血球からなるロゼットが、ヘテロ多量体を添加後、正常ヒト血漿に形成された。これに対して、抗C3b(i)特異的ヘテロ多量体がない状態では、オプソニン化された腫瘍細胞の大多数は赤血球と結合せず、少量のCR1が介在する免疫接着によって、わずかな比率が2または3個のみの赤血球と結合した(データは示していない)(Okadaら, 1974, Nature 248:521)。最後に、赤血球とヘテロ多量体を無処理の癌細胞とインキュベートしてもロゼットは得られなかった(データはここには示していない)。

【０２０５】

補体でオプソニン化された癌細胞は免疫磁気的方法で除去することができる

多くの形態の癌の治療への、免疫療法的アプローチのより最近のものの１つは、自家移植の前に自家骨髄または末梢血から癌細胞を除去することである(Tyerら, 1996, Clin. Cancer Res. 2:81)。この方法は現在のところ前立腺癌の治療には用いられていないが、前立腺癌細胞を用いることは、溶液中から選択的に癌細胞を除去するために補体と抗C3b(i)mAbを用いることの実現可能性の試験として合理的である。このアプローチは、カプルされたmAbの添加前にオプソニン化された癌細胞を洗浄することができ、C3b(i)フラグメントによる溶液相での競合を排除できるのでとくに魅力的である。表２に示すとおり、NHSを用いたLNCaP細胞とC4-2細胞の双方のオプソニン化後に、BioMag粒子に結合させた異なる特異性を有する抗C3b(i)mAbで処理すると非常に効率的な癌細胞の結合と除去がもたらされる。血清によるオプソニン化の際に癌細胞と結合するmAb 3E7がmAb 2H11での除去をブロックしなかった(表２)。

【０２０６】

表２：C3b(i)オプソニン化癌細胞の、抗C3b(i)mAbを用いた磁気パージングによる除去。結果は平均±SDで示す。

【表２】

| 細胞タイプ | 除去された細胞(%) | | 条件 |
|---|---|---|---|
| | 非処理 | オプソニン化されたもの | |
| LNCaP | 13±4 | 99.0±0.2 | $AB^+$血清、2H11 ビーズ |
| C4-2 | 4±2 | 98.0±0.3 | $AB^+$血清、2H11 ビーズ |
| C4-2 | 15±2 | 98.0±0.2 | $O^-$血清、2H11 ビーズ |
| C4-2 | 11±2 | 96.0±0.1 | $O^-$血清、2H11 ビーズ<br>オプソニン化の間 mAb 3E7 存在 |
| LNCaP | 18±3 | 98±1 | $O^+$血清、3E7 ビーズ |
| LNCaP | 21±2 | 99.0±0.3 | $O^+$血清、3E7 ビーズ<br>2% ヘマトクリット[a] |
| LNCaP | 20±5 | 96±1 | $O^+$血清、3E7 ビーズ<br>50% ヘマトクリット[b] |

[a]全血を3回洗い、細胞を50%血清で2%のヘマトクリットとなるように再構成した。

[b]全血を3回洗い、細胞を血清で50%のヘマトクリットとなるように再構成した。

【０２０７】

実験を全血に近似させ補体活性化が行えるようにした再構成系で行った場合には強固で特異的な結合が起こることが示される(表３)。全血での実験を補体活性化をブロックするEDTA中で行うと、C4-2細胞の抗C3b(i)ビーズへの結合はバックグラウンドのレベルまで低下する。全血での実験を補体活性化を行いうる2つの条件下(血清、またはクエン酸加血漿)で行うと、C4-2細胞のmAb 3E7磁気ビーズへの高レベルの結合が認められた(表３)。フローサイトメトリーでの検出を容易にするためにCD34陽性細胞でスパイクした再構成血液サンプルでの同様な実験では、全条件下で双方のタイプのビーズへのいくらかの細胞の非特異的結合が明らかに認められたが、補体活性化後の抗C3b(i)をコートしたビーズ(3E7)によるCD34陽性細胞の除去は認められなかった(表３)。正常細胞に対する抗C3b(i)磁気ビーズパージングの影響のフローサイトメトリーによる分析では(表４)、$CD4^+$ もしくは$CD8^+$ Tリンパ球、または顆粒球の特異的な除去はみられない。血清で処理した$CD14^+$ の単球では対照に比べていくらかの減少が認められた。この減少はクエン酸加血漿では観察されなかった。

【０２０８】

表３：全血中の癌細胞および前駆細胞に対するパージング（除去）の影響。C4-2癌細胞を標的とした結果は$^{51}Cr$標識細胞に基づいたものである。$CD34^+$ 細胞の保持は$CD34^+$ 細胞でスパイクしたサンプルのフローサイトメトリー分析によって調べた。結果は平均±SDで示す。

【表３】

| 条件 | C4-2 癌細胞を標的とした除去(%) | | パージング後の $CD34^+$細胞の保持 (細胞個数/μL) | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 3E7 ビーズ | IgG ビーズ | 3E7 ビーズ | IgG ビーズ | ビーズなし |
| 50%血清[a] | 98±1 | 3±0.3 | 6.5±1 | 6.5±2 | 17±5 |
| 50%血清[a] | 8±1 | 5±0.5 | | | |
| クエン酸塩[b] | 84±8 | 9±3 | 11±2 | 8±1 | 21±1 |
| EDTA[b] | 10±5 | 13±3 | 8±2 | 11±3 | 20±2 |

[a]全血は3回洗い、細胞は血清または血漿で50%ヘマトクリットとなるように再構成した。

[b]クエン酸塩またはEDTAで抗凝固させた全血。

【０２０９】
表４：Tリンパ球、顆粒球、および単球の集団に対するパージングの影響のフローサイトメトリー分析。クエン酸塩もしくはEDTAで抗凝固させた全血を用いるか、または、洗浄血液細胞を血清中で50%のヘマトクリットとなるように再構成した。3E7：抗C3b(i)をコートした磁気ビーズ、IgG：対照の無関係な抗体をコートしたビーズ。
【表４】

| 条件 | 細胞集団(細胞個数/μL) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | CD3/CD4 | | | CD3/CD8 | | | 顆粒球 | | | CD14 | | |
| ビーズ | 3E7 | IgG | ナシ | 3E7 | IgG | ナシ | 3E7 | IgG | ナシ | 3E7 | IgG | ナシ |
| 50%血清 | 730 | 650 | 730 | 370 | 330 | 370 | 2900 | 3300 | 3000 | 280 | 400 | 620 |
| クエン酸塩,実験１ | 750 | 660 | 900±60 | 380 | 340 | 470±30 | 3400 | 3500 | 3500±500 | 500 | 530 | 540 |
| クエン酸塩,実験２ | 600 | ND | 800 | 370 | ND | 560 | 2700 | ND | 2900 | ND | ND | ND |
| EDTA,実験１ | 790 | 680 | 910 | 420 | 370 | 480 | 3000 | 3250 | 3300 | 370 | 410 | 580 |
| EDTA,実験２ | 630 | ND | 760 | 420 | ND | 490 | 3500 | ND | 3400 | ND | ND | ND |

【０２１０】
フローサイトメトリー実験では星状細胞腫(U-87 MG; ATCC)、乳癌(MDA-MB-231; ATCC)、大腸癌(LoVo; ATCC)、肺癌(CCD-16Lu; ATCC)、および骨肉腫(MG-63; ATCC)を含むいくつかの他の癌細胞系統が、図１Aに示される結果を得るために用いられたAB陽性血清で、C3b(i)で効率的にオプソニン化された。オプソニン化後、陽性とされた細胞は94%を超え、これに対してバックグラウンドのレベル(オプソニン化前)は5%未満であった(データはここには示していない)。
【０２１１】
放射性標識抗C3b(i)mAbはin vitroで前立腺癌細胞を殺すことができる
癌特異的mAbの別の適用としては、放射性物質をmAbにカプリングさせて腫瘍の造影または破壊を起こさせるものがある(Glennie MJ, French RR, 「二重特異的抗体とともに用いて標的を狙う薬剤、毒素、および放射性核種」"Targeting drugs, toxins, and radionuclides with bispecific antibodies", Fanger MW編「二重特異的抗体」"Bispecific Antibodies" Austin編, RG Landis Co.; 1995, p107-20)。このアプローチの能力については、$^{131}$Iで抗C3b(i)mAbを標識し、次いで培養液中での癌細胞の殺滅の有効性について試験して調べた。血清でオプソニン化し、溶液相中で(方法の項参照)放射性標識mAbと反応させた後、細胞をプレートに蒔いた。実験は全て血清でオプソニン化したものと無処理のものの双方、ならびに放射性標識した、アイソタイプが適合する無関係のmAbを用いた。細胞傷害性のレベルは大きくはなかったが、血清でオプソニン化したLNCaPおよびC4-2細胞の$^{131}$I標識抗C3b(i)mAbによる殺滅の進行が3日間から6日間にわたって認められた(図７)。オプソニン化しなかった腫瘍細胞、または$^{131}$I標識した無関係のmAbで処理した細胞を含んでいる対照の培養物では細胞死は観察されなかった。オプソニン化されmAbで処理されたLNCaPおよびC4-2前立腺癌細胞を組織培養ウエル中に蒔いた後にも同様の殺滅パターンが示された(データはここには示していない)。
【０２１２】
6.3. 考察
C3bおよびそのフラグメントが腫瘍患者の癌細胞の表面上に沈着しうることはかねてから認識されていた(Okadaら, 1974, Nature 248:521-25; Irieら, 1974, Science 186:454-456; Vetvickaら, 1996, J. Clin. Invest. 98:50-61; Vetvicka Vら, 1997, J. Immunol. 159:599-605; およびVetvickaら, 1999, Clin. Exp. Immunol. 115:229-35)。この反応は天然のIgMで促進される。Springerやその他の研究は、天然のIgMレパートリーが、正常組織には見出せない癌細胞関連炭水化物エピトープを認識することを示唆している(Hakomoriら, 1996, Canc. Res. 56:5309-18; Castronoveら, 1989, J. Nat. Canc. Inst. 81:2

12-6; Springerら, 1984, Science 224:1198-206; Springerら, 1997, J. Mol. Med. 75: 594-602; およびDesaiら, 1995, J. Immunol. Methods 188:175-85)。事実、数名の研究者らはある種の癌に対する能動免疫応答を誘導するために炭水化物エピトープをワクチンとして用いている(Springerら, 1984, Science 224:1198-206; Springerら, 1997, J. Mol. Med. 75:594-602; Livingstonら, 1997, Canc. Immunol. Immunotherapy 43:324-30; およびZhangら, 1998, Canc. Res. 58:2844-9)。本明細書中に示した知見は沈着したC3b(i)を腫瘍関連膜抗原として用いて一般的な診断的および治療的方法をデザインするために有用であることを示すものである。

【０２１３】

NHSでのオプソニン化後の癌細胞上に多量のC3b(i)が特異的に沈着することが示された(図１、２、および３、ならびに表１)。図１および４に示したとおり、防護的な作用をすると考えられるIgMのレベルは乳癌患者を含む癌患者ではしばしば低下している(Desaiら, 1995, J. Immunol. Methods 188:175-85; Seegalら, 1976, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 52:205-11; Higuchiら, 1980, J. Lab. Chin. Immunol. 5:407-18; およびGrossら, 1988, Eur. J. Canc. Chin. Oncol. 24:363-7)。従って、癌患者のよっては正常ヒト血漿を輸注することは血流が到達しうる腫瘍部位のC3b(i)オプソニン化の復活または増強を助長することとなる。しかしながら、正常ヒト血漿が多量のC3b(i)を癌細胞表面上に沈着させても、癌細胞は高レベルの補体制御タンパク質をしばしば発現しているため、この作用単独で腫瘍を根絶するのに十分とは考えられない(Gorterら, 1996, Lab. Invest. 74:1033-49; Maenpaaら, 1996, Am. J. Path. 148:1139-52; およびLiら, 1997, Int. J. Canc. 71:1049-55)。例えば、癌細胞によるCD59(「プロテクチン」)の発現は、それがなければ癌細胞を溶解してしまいうる膜傷害複合体の作用をブロックする。本明細書で提示した結果は、癌治療の１つのアプローチは、患者に正常ヒト血漿(IgMと必要があれば補体を供給するために)を輸注し、全身投与用抗癌剤を、体内を循環してオプソニン化された腫瘍細胞に向かう抗C3b(i)mAbとコンジュゲートさせて癌細胞に送達させるものである。

【０２１４】

腫瘍細胞の近傍に十分な量の治療用剤の送達するために、mAbをベースとする癌の免疫療法にはmAbの腫瘍に対する非常に高いレベルの選択的かつ高い結合活性が必要となる。これらの結果は少なくとも50,000のC3b(i)エピトープがオプソニン化された前立腺癌細胞上で利用可能であり、in vitroでの殺滅研究に基づけば、このレベルの癌関連抗原があれば癌細胞を特異的に標的とするには十分なはずであり、これによって多量の治療剤または診断用剤の送達が可能となる。

【０２１５】

治療剤を腫瘍組織特異的に送達することは健康な組織に望ましくない傷害を与えることを避けるために非常に重要である。C3b(i)を標的として用いる場合には、補体の活性化が腫瘍細胞に限局されることが重要である。2,3の比較的まれな疾患の状態を除けば(Rooseら, 1995, Blood 86:3277-86; Morgan BP, Complement:clinical aspects and relevance to disease, ed. London: Harcourt Brace Jovanovich; 1990)、補体系は高度に調節されており、C3b(i)は正常組織には沈着しない。さらに、C3b(i)の沈着はヒト前立腺組織の悪性腫瘍の領域に限局していることが示されており、良性(図５A)および増殖性領域ではみられない(データは示していない)。これらのデータは乳癌での初期の研究を確認するものであり、その研究では同様なオプソニン化の腫瘍組織特異的パターンが立証されている(Vetvickaら, 1997, J. Immunol. 159:599-605; Howardら, 1979, Cancer 43:2279-87; およびNiculescuら, 1992, Am. J. Path. 140:1039-43)。

【０２１６】

正常なターンオーバーのために、循環血液中のC3の小フラクションがC3b(i)と類似の抗原性のエピトープを発現し、この内因性のC3b(i)様分子が抗C3b(i)mAbの作用をブロックする可能性がある(Mollnesら, 1987, J. Immunol. Methods 101:201-7; Petronisら, 1998, Clin. Nuc. Med. 23:672-7)。溶液相中で補体活性化の際にC3b(i)のフラグメントが生ずるとこれもmAbの癌細胞への結合をブロックする傾向があり、事実、mAb 7C12はC3bでオプ

ソニン化された癌細胞とはその癌細胞が洗浄された後しか結合しない(データは示していない)。しかし、IgMと、または癌細胞上の炭水化物と直接的に共有結合で連結されたC3b(i)は、溶液中でC3bフラグメントによって発現された抗原決定基とは異なるユニークで特異的な抗原決定基を有しているはずであり、そのような細胞関連分子に特異的なmAbの産生が可能なはずである。mAb 3E7、これはオプソニン化ステップの間に癌細胞に結合可能であるが(図３)、このものは2H11 ビーズを用いたパージングをブロックしなかった(表２)。癌細胞に共有結合で結合したC3b(i)に対してより大きな結合の特異性を有するような他のmAbを開発することができるものと思われる。

【０２１７】

補体でオプソニン化された癌細胞を標的としパージングするために抗C3b(i)mAbを用いるようなex vivoでの適用の実現可能性について示すが(表２および３)、その方法ではまず最初に競合する可能性のあるC3b(i)フラグメントを洗浄して除去する。この方法は前駆細胞の最も代表的なものであるCD34陽性細胞(Bensinger, W.I., 1998, Bone Marrow Transplant 21:113; LaCasseら, 1999, Blood 94:2901; およびVeccioら, 1999, Blood 93:1858)を含む正常細胞をなしですますことができるものと思われる(表３および４)。自家移植のためのパージングの治療上の有効性については依然として議論がある(Bensinger, W.I.,1998, Bone Marrow Transplant 21:113)。自家移植後に、夾雑していた癌細胞が腫瘍の復活を実際に促進すると考えることは合理的であり(Schneidermanら, 1998, Radiat. Res. 149:147; およびVescioら, 1999, Blood 93:1858)、Bensiger(1998, Bone Marrow Transplant 21:113)が述べているとおり、パージングプロトコールの有効性を決定するためには注意深い、対照をおいた試験が必要であろう。骨髄または幹細胞標品から癌細胞をパージングするための方法としていくつかの他の方法が最近報告されており(LaCasseら, 1999, Blood 94:2901; LazzaroらJ, 1995, Exp. Hematol. 23:1347; およびSchneidermanら, 1998, Radiat. Res. 149:147)、C3b(i)ターゲティングは強力で正規な（orthogonal）アプローチを提供することができる。これらの方法をC3b(i)をベースとするターゲティングと並行して用いれば、骨髄または末梢血幹細胞から自家移植の前に癌細胞を非常に効果的にパージングすることができるようになろう。

【０２１８】

赤血球または免疫エフェクター細胞(Gastら, 1997, Cancer Immunol. Immunother. 45:121; Rennerら, 1995, Immunol. Rev. 145:179; およびSegal DM, Bakacs T, Jost CR, KuruezI, Sconocchia G, Titus JA(1995) 「T細胞による標的を定めた細胞傷害性」"T-cell targeted cytotoxicity", Fanger MW(編)「二重特異性抗体」"Bispecific antibodies"中の記載、Landis, Austin, Tex, p27-42; およびTaylorら, 1997, Cancer Immunol. Immunother. 45:152)と結合した二重特異的mAb複合体中の抗C3b(i)mAbの使用については我々のロゼット形成のデータによって説明される(図６)。抗C3b(i) x 抗CR1ヘテロ多量体の存在下では、赤血球はヒト血清でオプソニン化した前立腺癌細胞で完全に取り囲まれた。種々のグレードとステージにある前立腺癌を有する男性で、循環血液中に「微小転移性」前立腺癌細胞が認められた(Sokoloffら, 1996, Cancer 77:1862)。可能な治療のアプローチの１つは、前立腺癌の男性に抗C3b(i)ヘテロ多量体構築物の輸注を、正常血清の輸注と同時に、またはその直後に、腫瘍細胞を標的とするために行うことである。

【０２１９】

腫瘍細胞がひとたびオプソニン化されれば、毒性物質または放射性同位元素とと結合させた抗C3b(i)mAbを各患者に投与することができる。このアプローチが可能な使用を図７に示した。LNCaP細胞とC4-2細胞を$^{131}$I標識特異的抗C3b(i)mAbで処理すると、その$^{131}$I抗C3b(i)mAbでの処理前にNHSでオプソニン化されていた細胞のみが殺滅された。腫瘍細胞の沈着が効果的にオプソニン化され、抗C3b(i)mAbをコンジュゲートした化合物の標識となる場合には、PROSTASCINT$^{TM}$スキャンと同様に、このアプローチはまた診断用の造影目的にも用いることができる(Petronisら, 1998, Clin. Nuc. Med. 23:672-7)。

【０２２０】

本明細書に示した結果は、正常ヒト血清でのオプソニン化は前立腺癌細胞上にIgMおよびC

3b(i)の多量の沈着をもたらすが、前立腺癌の多くの男性から得た血清でオプソニン化すると、細胞に会合するIgMおよびC3b(i)のレベルが非常に低下する。このような欠損はヒトIgM、これは究極的にはC3b(i)での癌細胞のオプソニン化を可能とするものであるが、そのソースとして正常血漿を輸注することによって復活させることができる。従って、これらのオプソニン化された細胞は、適切なC3b(i)mAbの標的となるためのユニークで特異的な抗原決定基を提示することとなる。

【０２２１】

7．実施例：抗C3b(i)抗体の赤血球への結合能に及ぼす抗原特異的抗体の影響

以下の実施例は、癌抗原と免疫特異的に結合する抗体が存在すると、オプソニン化された腫瘍細胞が、C3b(i)と補体レセプターCR1との双方に対して二重特異的なモノクローナル抗体(ヘテロ多量体)の存在下での赤血球への結合能を増大させることを示している。

【０２２２】

材料と方法

ある種の実験では、$^{51}$Cr標識ラジ細胞(B細胞リンパ腫のモデル)を血清中または0.01M EDTA(これは補体活性化をブロックする)含有の血清中に分散させた。それらの細胞を5μg/mLのRituximab(Genentech, CA)の存在または不在下で37℃で30分間インキュベートし、C3b(i)の沈着を起こさせた。次いでそれらの細胞を3回洗い、ヒト赤血球をヘマトクリットが50%となるように含有している正常ヒト血漿中に再分散した。2つの場合では、そのインキュベーション混合物はさらに、C3b(i)および補体成分CR1(HP7G9X3E7; "HP")の双方に対して二重特異的モノクローナル抗体を3μg/mL含有させた。さらに30分インキュベートした後、サンプルの100μLアリコートを1mLのficoll-hypaqueに重層し、500 X gで15分間遠心した。ラジ細胞に結合した$^{51}$CrカウントをE ペレット、および遊離のラジ細胞が見出される上清中で測定した。

【０２２３】

別の実験では、$^{51}$Cr標識ラジ細胞を、新鮮な血清で再構成した洗浄済みの全血に添加した。そのサンプルを次の試薬の種々の組み合わせの存在下で37℃で30分間インキュベートした：5μg/mLのRituximab; 3μg/mLのHP; Rituximab＋HPを一緒にインキュベート; RituximabをHPの15分前に添加; およびHPをRituximabの15分前に添加。さらに30分間インキュベートした後、重複して200μLのアリコートを分取し、1mLのficoll-hypaqueに重層し、500 X gで15分間遠心した。ラジ細胞に結合した$^{51}$CrカウントをE ペレット、および遊離のラジ細胞が見出される上清中で測定した。

【０２２４】

結果

図９および１０に示すとおり、ラジ細胞をヘテロ多量体の不在下で血清または血清中に再構成した全血とRituximabでオプソニン化した場合に比べると、ラジ細胞をヘテロ多量体の存在下で血清または血清中に再構成した全血とRituximabでオプソニン化した場合に比べて、大多数のラジ細胞が赤血球と結合した。また、ラジ細胞をヘテロ多量体の存在下で血清単独または血清中に再構成した全血単独でオプソニン化した場合に比べると、ラジ細胞をヘテロ多量体の存在下で血清または血清中に再構成した全血とRituximabでオプソニン化した場合に比べて、大多数のラジ細胞が赤血球と結合した(図９および１０)。さらに図１０に示すとおり、ラジ細胞をヘテロ多量体の存在下で血清中に再構成した全血とRituximabでオプソニン化した場合には、Rituximabとヘテロ多量体が同時にまたはそのどちらが先に添加されたか否かにかかわらず、赤血球に結合したラジ細胞の比率は同程度であった。同様な結果は、洗浄していない全血でも得られた。これらの結果は、癌細胞に対して免疫特異的な抗体の添加が癌患者における抗C3b(i)抗体の治療効果を増強することを示唆している。

【０２２５】

8．実施例：血清が介在する、細菌の赤血球への結合

2種類のグラム陰性細菌である大腸菌(Escherichia coli)および緑膿菌(Pseudomonasu aeruginosa)は、双方とも敗血症を起こしうるが、これらの菌を用いて血清の存在下での赤血

球との結合能を調べた。表２に示すとおり、正常血清の存在下では、これらの細菌は、補体を活性化し、共有結合でC3bを捕捉し、次いで補体活性化の最初の産物であるC3bに対して免疫特異的な補体レセプター1(CR1)を介することにより、霊長類の赤血球と結合することができる。サンプルバッファー(リン酸塩緩衝食塩水中に1% BSA)中、またはEDTA(補体活性化をブロックするため)含有の血清もしくは血漿中での結合は平均して、大腸菌で＜15%、緑膿菌で＜12%であった。細菌の一部のみが赤血球に結合し、時間とともに結合が実際に減少することは注目に価する(表５参照)。この減少の１つの説明としては、細菌に結合したC3bがさらに分解産物であるC3biとC3dgに転換し、霊長類の赤血球の補体レセプターはこれらのリガンドとは測定可能な程度のアフィニティーで結合はしないということである。

【０２２６】

表５：37℃での血清が介在する、細菌の赤血球への結合は時間依存性である

【表５】

| | 赤血球に結合した細菌の比率(%) | |
|---|---|---|
| 時間(分) | 大腸菌 | 緑膿菌 |
| 5 | 50 | 34 |
| 20 | 50 | 85 |
| 60 | 48 | 39 |
| 120 | 22 | 15 |

【０２２７】

9．実施例：緑膿菌の赤血球への結合能に及ぼす二重特異的モノクローナル抗体の影響

以下の実施例はCR1およびC3b(i)に対して二重特異的な抗体が、血清の存在下での緑膿菌の赤血球への結合能を増強させることを示している。

【０２２８】

緑色蛍光(GP)緑膿菌を、7G9x2H4(補体レセプターCR1および緑膿菌抗原に対して二重特異的なモノクローナル抗体)、7G9x7C12(補体レセプターCR1およびC3b(i)に対して二重特異的なモノクローナル抗体)、7G9x3E7(補体レセプターCR1およびC3b(i)に対して二重特異的なモノクローナル抗体)、またはヘテロ多量体(HP)なし、および30%から50%のヘマトクリットでヒト赤血球を含有している正常ヒト血清と、37℃で種々の期間インキュベートした。インキュベーション期間終了後、そのサンプルのアリコートを分取して100倍希釈し、GP緑膿菌の赤血球への結合はフローサイトメトリーで検出した。次いで、結合した赤血球のパーセントを、フローサイトメトリーで検出した、結合したGP緑膿菌と遊離のGP緑膿菌の数に基づいて計算した。実験1では、８μg/mLの7G9x2H4、7G9x7C12、または7G9x3E7を、GP緑膿菌および赤血球とインキュベートした。この実験では、赤血球数はGP緑膿菌の数を上回り、50:1の比であった。実験2では、1.3μg/mLの7G9x2H4または7G9x3E7をGP緑膿菌および赤血球とインキュベートした。この実験では、赤血球数はGP緑膿菌の数を上回り、10:1の比であった。実験3では、1.3μg/mLの7G9x2H4または7G9x3E7をGP緑膿菌および赤血球とインキュベートした。この実験では、赤血球数はGP緑膿菌の数を上回り、5,000:1の比であった。

【０２２９】

下記の表６に示すとおり、ヘテロ多量体不在の条件下で一緒にインキュベートした場合に比べて、二重特異的なモノクローナル抗体の存在下で15分間以上一緒にインキュベートした場合には、大部分のGP緑膿菌が赤血球と結合した。また、7G9x2H4の存在下では、赤血球と結合したGP緑膿菌の比率は、7G9x3E7の存在下で赤血球と結合したGP緑膿菌の比率と同程度であった。これらの結果は、C3b(i)に対して免疫特異的な抗体は補体成分を含有している血清中の緑膿菌などの微生物と、その微生物に特有な微生物抗原に対して免疫特異的な抗体と同様に、またはほぼ同様に、結合できることを示唆している。このように、これらの結果は微生物感染の治療における抗C3b(i)抗体の治療上の有用性を示唆している。

【０２３０】
表６：緑膿菌またはC3b(i)に特異的なヘテロ多量体は血清の存在下での赤血球への結合を増強する
【表６】

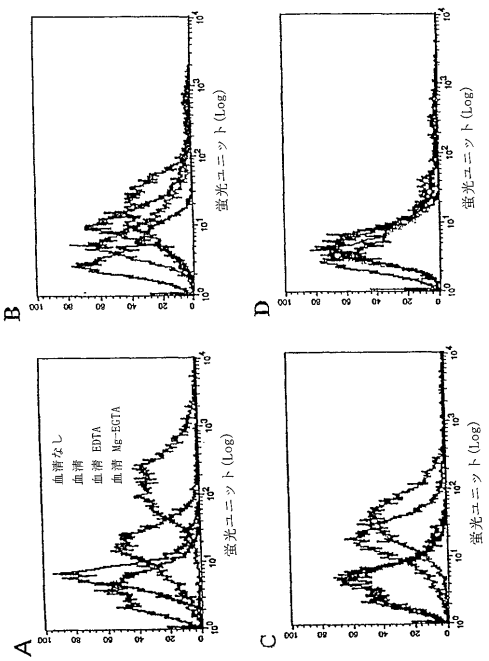
| | 赤血球に結合した緑膿菌の比率(%) | | | |
|---|---|---|---|---|
| 時間(分) | HPなし | 7G9x2H4 | 7G9x7C12 | 7g9x3E7 |
| *10 | 87 | 83 | 84 | 93 |
| *30 | 81 | 98 | 92 | 97 |
| *90 | 47 | 97 | 82 | 98 |
| **15 | 65 | 82 | ND | 82 |
| **90 | 32 | 70 | ND | 81 |
| ***10 | 98 | 98 | ND | 98 |
| ***60 | 91 | 93 | ND | 98 |

(*)実験１；(**)実験２；(***)実験３；(ND)測定せず

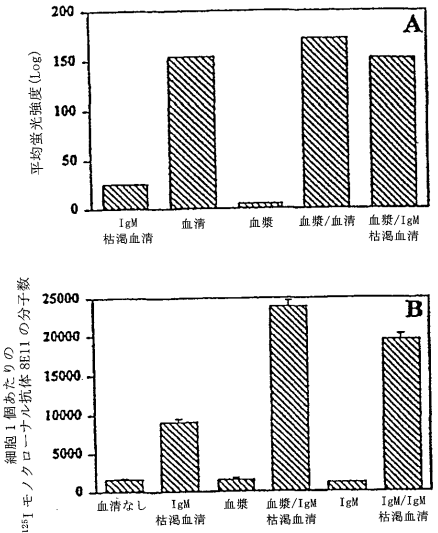
【０２３１】
例示した実施形態は本発明の単なる１つの態様を説明することを意図したものであり、本発明はその範囲に限定されるべきものではない。本明細書に記載し、示したものに加えて本発明に種々の改変を加えられることは当業者であれば前述の説明と付属の図面から明白であろう。そのような改変は添付の特許請求事項の範囲内にあるものであることを意図している。
【０２３２】
本明細書中に引用した公表文献の全ては、参照としてその全体を本明細書に組み入れるものとする。
【図面の簡単な説明】
【０２３３】
【図１】図１(A-D)は、正常なドナー(A, B)および癌患者(C, D)から得た血清を用いた研究で得られたフローサイトメトリーデータを示す。C4-2ヒト前立腺癌細胞上へのC3b(i)(A, C)およびIgM(B, D)の沈着の測定を示している。正常ヒト血清の添加に応答してC4-2癌細胞上には多量のC3b(i)が沈着している；このオプソニン化は古典的経路および第二経路の双方の補体活性化経路によって行われているものと考えられる。前立腺癌患者から得た血清を用いてオプソニン化した後では、その腫瘍細胞上へのC3b(i)およびIgMの腫瘍細胞への沈着は著しく少ない（C, D）。しかしながら、第二経路(Mg-EDTAを添加した血清)を介したC3b(i)の沈着は正常および癌患者の血清で同程度であり、このことは補体活性化の第二経路が前立腺癌患者の血清中でも依然として無傷であることを示唆している。
【図２】図２(A-B)はAB-陽性血清からのIgMの除去がLNCaP(A)またはC4-2(B)細胞上へのC3b(i)の沈着量の大きな低下をもたらすことを示すフローサイトメトリー(A)およびラジオイムノアッセイ(B)データを示す。C3b(i)の沈着は、ヒトIgMのソースを提供する正常なヒト全血清(A, B)(例えば血漿/IgM減少血清)、もしくは、精製IgM/IgM減少血清のいずれかの添加によって回復させることができる(B)。
【図３】図３(A-B)は、125I標識mAb 7C12および3E7の双方の結合で定義するとき、補体の活性化によって50,000個から300,000個の間のC3b(i)エピトープ/オプソニン化癌細胞(結合のネットの数、バックグラウンド値は差し引いている)が産生されることを示している。パネルAでは、オプソニン化にAB-陽性血清が用いられ、3回洗った後、細胞を種々の量の2種類のmAbで調べた。あるいはまた、mAb3E7を血清添加の直前に細胞に添加し、オプソニン化の間、存在させた。パネルBでは、AB-陽性血清を1μg/mLおよび10μg/mLのプローブと結合させて用い、AB-陽性クエン酸加血漿(パネルAで用いた血漿とは異なるドナーのもの)を3μg/mLプローブに対して用いた。

【図４】図４は正常ドナーおよび前立腺癌患者から得た血清の検査から得られたフローサイトメトリーの結果を示す。ヒト免疫グロブリンのLNCaPおよびC4-2前立腺癌細胞への結合を測定した。t-検定で有意差が認められた。
【図５】図５(A-B)は正常なヒト前立腺組織(A)と癌の組織(B)の抗C3b(i)mAbとインキュベートした後の免疫組織化学的染色を示す。
【図６】図６は赤血球と血漿中抗CRI X 抗C3b(i)二重特異的モノクローナル抗体複合体(7G9 X 3E7)存在下でインキュベートしたオプソニン化LNCaP前立腺癌細胞を用いたロゼット形成実験を示す。
【図７】図７(A-B)は、131I標識mAbを用いたLNCaP(A)およびC4-2(B)前立腺癌細胞のin vitroでの殺滅を示している。破線(－－)は無関係な131I標識mAbで処理した正常血清でオプソニン化した細胞を示し；点線(……)は131I標識抗C3b(i)mAbで処理したオプソニン化していない細胞を示し；実線(―)は131I標識抗C3b(i)mAbで処理した、正常血清でオプソニン化した細胞を示す。測定は非処理細胞に比較した細胞の増殖で行った。
【図８】図８は本発明の工程を図示するもので、それらの工程の全てが癌患者の体内の腫瘍細胞の細胞表面上で起こる。第1の工程では、ヒトIgM(内因性のもの、または患者の体内に注入されたもの)は癌細胞上の特異的な部位に結合する。第2の工程では、補体(内因性のもの、または患者の体内に新鮮血漿として注入されたもののいずれか)が活性化され、その結果得られた蛋白分解酵素による断片C3b(i)が癌細胞上の表面に沈着する。第3の工程では、C3b(i)エピトープに特異的なmAbが投与される。そのmAbは、毒性、酵素、遺伝子、分化に対する作用剤、および/または造影剤と共に用いることができ(従ってそのmAbは「エフェクターmAb」である)、その結果癌細胞の破壊または造影が行われる。
【図９】図９は赤血球とオプソニン化したラジ細胞を用いた赤血球結合実験を示す。ラジ細胞は次のものを用いて処理した：血清単独；EDTA処理血清単独：血清とRituximab；EDTA処理血清とRituximab；血清と抗C3b(i) X 抗CR1二重特異的モノクローナル抗体複合体；EDTA処理血清と抗C3b(i) X 抗CR1二重特異的モノクローナル抗体複合体；血清、Rituximab、および抗C3b(i) X 抗CR1二重特異的モノクローナル抗体複合体；およびEDTA処理血清Rituximab、および抗C3b(i) X 抗CR1二重特異的モノクローナル抗体複合体。
【図１０】図１０は赤血球とオプソニン化したラジ細胞を用いた赤血球結合実験を示す。ラジ細胞は次のものを用いて処理した：洗浄した全血で再構成した血清単独；洗浄した全血で再構成した血清とRituximab；洗浄した全血で再構成した血清と抗C3b(i) X 抗CR1二重特異的モノクローナル抗体複合体；ならびに洗浄した全血で再構成した血清、Rituximab、および抗C3b(i) X 抗CR1二重特異的モノクローナル抗体複合体；洗浄した全血で再構成した血清、Rituximab(15')、および抗C3b(i) X 抗CR1二重特異的モノクローナル抗体複合体；ならびに洗浄した全血で再構成した血清、抗C3b(i) X 抗CR1二重特異的モノクローナル抗体複合体(15')、およびRituximab。

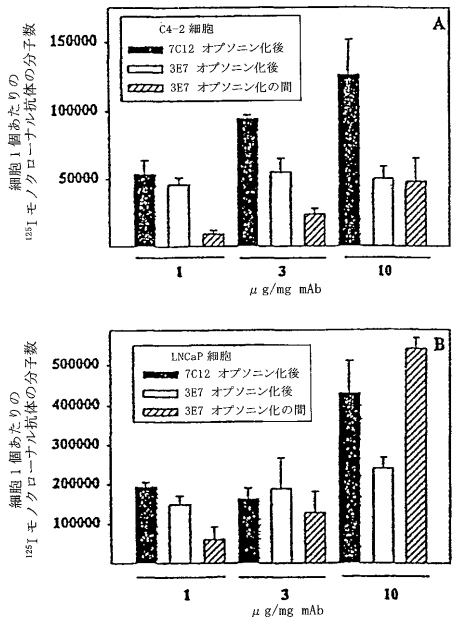
【図１】


A
B
C
D
蛍光ユニット(Log)
血清なし
血清
血清 EDTA
血清 Mg-EGTA

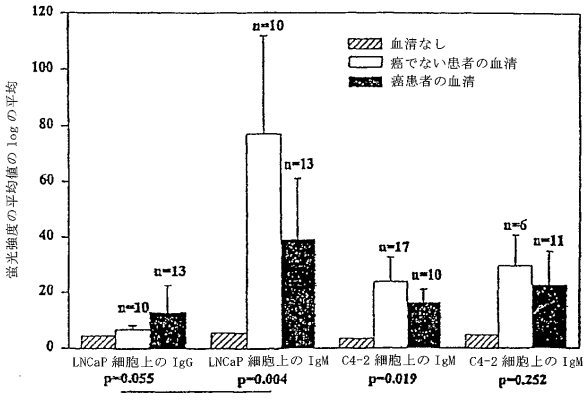
【図２】


A
平均蛍光強度(Log)
IgM 枯渇血清
血清
血漿
血漿/血清
血漿/IgM 枯渇血清
B
細胞１個あたりの 125I モノクローナル抗体 8E11 の分子数
血清なし
IgM 枯渇血清
血漿
血漿/IgM 枯渇血清
IgM
IgM/IgM 枯渇血清

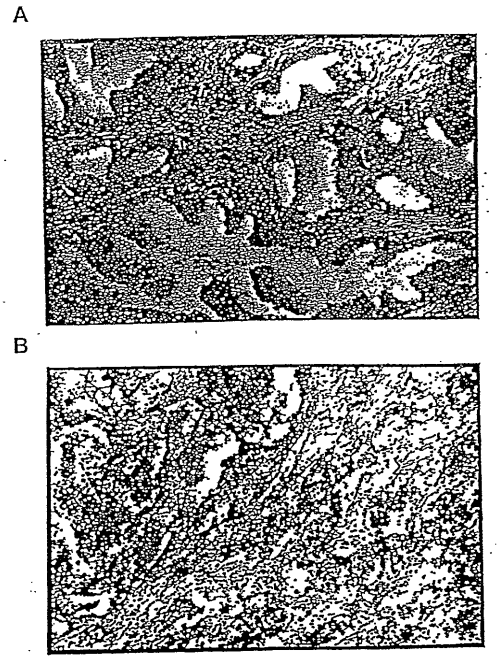
【図３】


A
C4-2 細胞
7C12 オプソニン化後
3E7 オプソニン化後
3E7 オプソニン化の間
細胞１個あたりの 125I モノクローナル抗体の分子数
μg/mg mAb
B
LNCaP 細胞
7C12 オプソニン化後
3E7 オプソニン化後
3E7 オプソニン化の間
細胞１個あたりの 125I モノクローナル抗体の分子数
μg/mg mAb

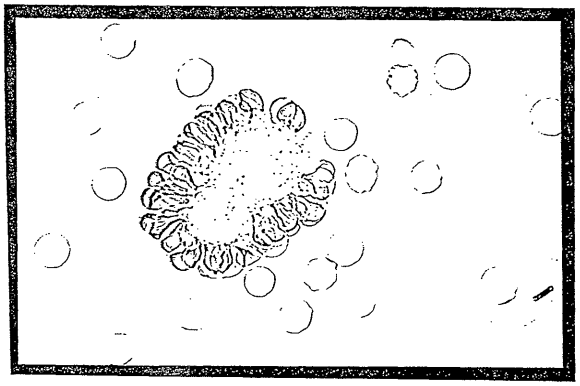
【図４】


蛍光強度の平均値の log の平均
血清なし
癌でない患者の血清
癌患者の血清
n=10
n=13
n=10
n=13
n=17
n=10
n=6
n=11
LNCaP 細胞上の IgG
LNCaP 細胞上の IgM
C4-2 細胞上の IgM
C4-2 細胞上の IgM
p=0.055
p=0.004
p=0.019
p=0.252

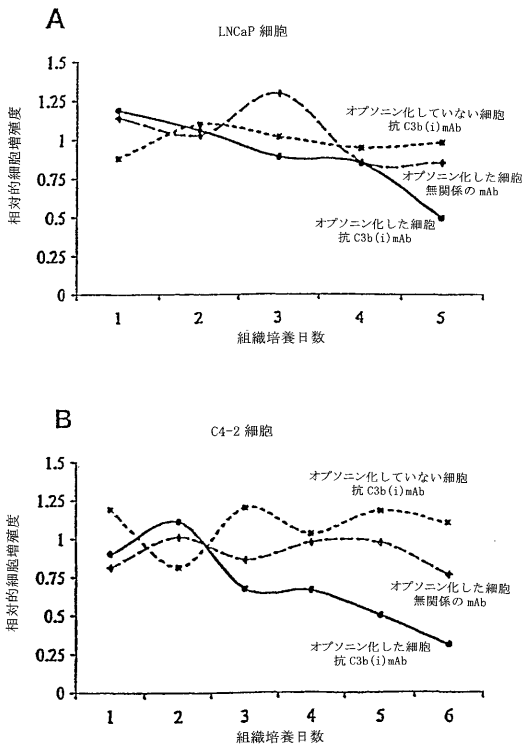
【図５】


A
B

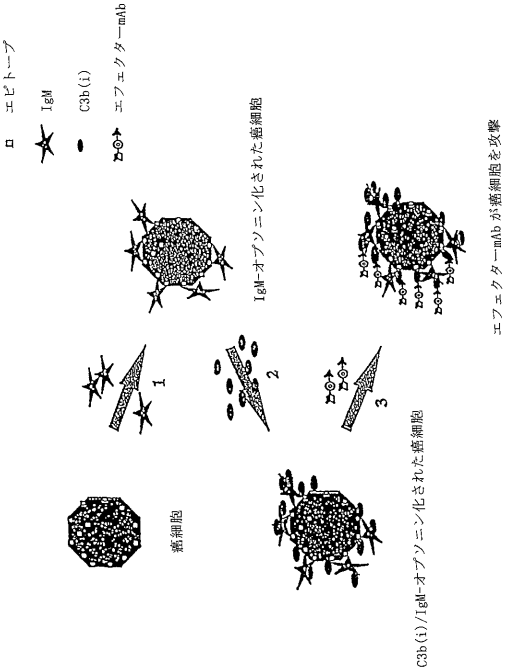
【図６】



【図７】


A
LNCaP 細胞
相対的細胞増殖度
1.5
1.25
1
0.75
0.5
0.25
0
1
2
3
4
5
組織培養日数
オプソニン化していない細胞
抗 C3b(i)mAb
オプソニン化した細胞
無関係の mAb
オプソニン化した細胞
抗 C3b(i)mAb
B
C4-2 細胞
相対的細胞増殖度
1.5
1.25
1
0.75
0.5
0.25
0
1
2
3
4
5
6
組織培養日数
オプソニン化していない細胞
抗 C3b(i)mAb
オプソニン化した細胞
無関係の mAb
オプソニン化した細胞
抗 C3b(i)mAb

【図８】


エピトープ
IgM
C3b(i)
エフェクター—mAb
IgM-オプソニン化された癌細胞
エフェクター—mAb が癌細胞を攻撃
1
2
3
癌細胞
C3b(i)/IgM-オプソニン化された癌細胞

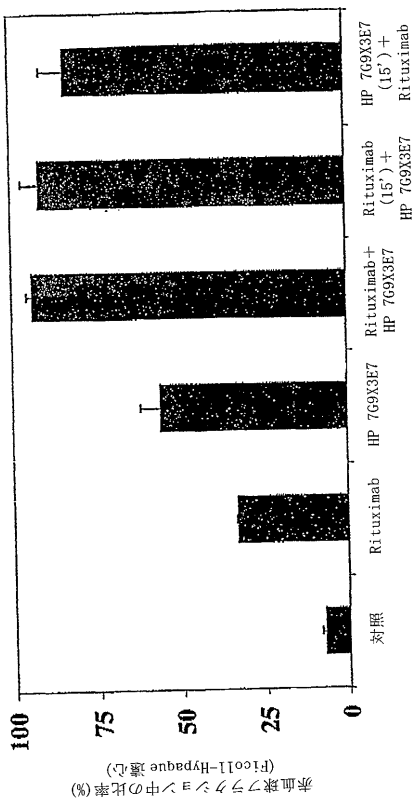
【図９】

血清とRituximabでオプソニン化したラジ細胞は、抗CR1 x 抗C3b(i) HPを介して赤血球に結合する




【図１０】

Rituximabおよび抗CR1 x 抗C3b(i) HPの存在下でのオプソニン化したラジ細胞*への赤血球への結合




＊血清中に再構成した、洗浄済全血

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
6 June 2002 (06.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/43570 A2

(51) International Patent Classification[7]: A61B

(21) International Application Number: PCT/US01/44813

(22) International Filing Date:
28 November 2001 (28.11.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/724,620 28 November 2000 (28.11.2000) US

(71) Applicant: **UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION** [US/US]; Towers Office Building, Suite 1-110, 1224 West Main Street, Charlottesville, VA 22903 (US).

(72) Inventors: **TAYLOR, Ronald**; 108 Kerry Lane, Charlottesville, VA 22901 (US). **NARDIN, Alessandra**; 12, rue de Langeac, F-75015 Paris (FR). **SUTHERLAND, William, M.**; 4275 Viewmont Road, Earlysville, VA 22936 (US). **SOKOLOFF, Mitchell, H.**; 620 South Garfield Avenue, Hindsdale, IL 60521 (US). **CHUNG, Leland, W., K.**; 1111 Rocky Road, Lovingston, VA 22949 (US).

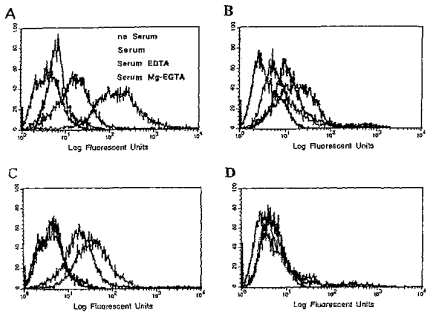
(74) Agents: **BALDWIN, Geraldine, F.** et al.; Pennie & Edmonds LLP, 1155 Avenue of the Americas, New York, NY 10036 (US).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, 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, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*[Continued on next page]*

(54) **Title:** METHODS FOR THE PREVENTION AND TREATMENT OF CANCER USING ANTI-C3B(i) ANTIBODIES




(57) **Abstract:** The present invetion relates to mehtods of treating and preventing cancer in an animal comprising administrating to said animal antibodies specific for C3b(i). The present invention also realtes to mehtods of treating and preventing cancer in an animal comprising administering to said animal IgG antbodies, IgM antibodies and/or complement components in combination with antibodies immunospecifically bind to one or more cancer cell antigens in combination with antibodies immunospecific for C3b(i). The present invention further relates to pharmaceutical compositions for the treatment and prevention of cancer comprising one or more antibodies immunospecific for C3b(i) and one or more antibodies immunospecific for one or more cancer cell antigens.

WO 02/43570 A2

WO 02/43570 A2

**Published:**
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

# METHODS FOR THE PREVENTION AND TREATMENT OF CANCER USING ANTI-C3b(i) ANTIBODIES

## 1. INTRODUCTION

The present invention relates to methods of treating and preventing cancer in an animal comprising administrating to said animal antibodies specific for C3b(i). The present invention also relates to methods of treating and preventing cancer in an animal comprising administering to said animal IgG antibodies, IgM antibodies and/or complement components in combination with antibodies immunospecific for C3b(i). The present invention also relates methods of treating and preventing cancer in an animal comprising administrating to said animal antibodies that immunospecifically bind to one or more cancer cell antigens in combination with antibodies immunospecific for C3b(i). The present invention further relates to pharmaceutical compositions for the treatment and prevention of cancer comprising one or more antibodies immunospecific for C3b(i) and one or more antibodies immunospecific for one or more cancer cell antigens.

## 2. BACKGROUND OF THE INVENTION

The complement system which is composed of some 21 plasma proteins plays an important role in the human immune system, both in the resistance to infections and in the pathogenesis of tissue injury. The activated products of the complement system attract phagocytic cells and greatly facilitate the uptake and destruction of foreign particles by opsonization. There are two distinct pathways for activating complement, the classical pathway and the alternate pathway, that result in conversion of C3 to C3b and subsequent responses (*e.g.*, the formation of the membrane attack complex ("MAC")). Activation of the classical pathway is initiated by antigen-antibody complexes or by antibody bound to cellular or particulate antigens. The alternate pathway is activated independent of antibody by complex polysaccharides in pathogens such as bacterial wall constituents, bacterial lipopolysaccharides (LPS), and cell wall constituents of yeast (zymosan).

The classic complement pathway is initiated by the binding of C1 to immune complexes containing IgG or IgM antibodies. Activated C1 cleaves C2 and C4 into active components, C2a and C4b. The C4b2a complex is an active protease called C3 convertase, and acts to cleave C3 into C3a and C3b. C3b forms a complex with C4b2a to produce C4b2a3b, which cleaves C5 into C5a and C5b. C5b combines with C6, and the C5b6 complex combines with C7 to form the ternary complex C5b67. The C5b67 complex binds C8 to form the C5b678 complex which in turn binds C9 and results in the generation of the

C5-C9 MAC. The insertion of the MAC into the cell membrane results the formation of a transmembrane channel that causes cell lysis.

In the alternative pathway, conversion of C3 to C3b (or C3i) produces a product that can combine with factor B, giving C3bB (or C3iB). These complexes are acted upon by factor D to generate C3bBb, which is a C3 convertase capable of cleaving more C3 to C3b, leading to more C3bBb and even more C3 conversion. Under certain circumstances the C3bBb complex is stabilized by association with the positive regulator properdin (P) by association of C3b and Bb. The C3 convertases can associate with an additional C3b subunit to form the C5 convertase, C3bBbC3b, which is active in the production of the C5-C9 MAC.

In both the classical and alternative pathways, the critical step in the activation of complement is the proteolytic conversion of C3 to the fragments C3b and C3a. C3a is an anaphylatoxin that attracts mast cells to the site of challenge, resulting in local release of histamine, vasodilation and other inflammatory effects. The nascent C3b has an ability to bind to surfaces around its site of generation and functions as a ligand for C3 receptors mediating, for example, phagocytosis.

Endogenous cell surfaces normally exposed to complement are protected by membrane-bound regulators such as decay accelerating factor ("DAF"), C59 ("protectin"), MCP, and the soluble C1 inhibitor or C1NH. DAF and MCP are responsible for limiting production of C3b and insure the generation of inactive forms of C3b, C3bi and C3dg from C3b. CD59 prevents attack of the MAC, which would otherwise destroy the cancer cell. C1 inhibitor binds to the active subcomponents of C1, C1r and C1s, and inhibits their activity.

### 2.1. CANCER TREATMENT

Despite advances in prevention and early detection, refinements in surgical technique, and improvements in adjuvant radiotherapy and chemotherapy, the ability to cure many patients of cancer remains elusive. This is especially pertinent to prostate cancer, which remains the most prevalent visceral tumor in American men, with approximately 180,000 new cases and nearly 40,000 deaths expected in 1999 (Landis et al., 1999, Cancer J Clin 49: 8-31). The continuing challenge of prostate cancer treatment is the successful management and eradication of recurrent, metastatic, and hormone-refractory disease, which accounts for the vast majority of prostate cancer-specific morbidity and mortality (Small, 1998, Drugs and Aging13:71-81).

Many treatment modalities currently under investigation for prostate and other cancers depend upon tissue-specific delivery of anti-neoplastic agents. One

immunotherapeutic approach involves conjugating cytotoxic agents to monoclonal antibodies (mAbs) specific for a particular cancer cell epitope. In this manner, the therapeutic agents can be delivered at a high therapeutic dose directly, and selectively, to the tumor site, thereby minimizing injury to healthy tissue (Bach et al., 1993, Immunol Today 14:421-5; Reithmuller et al., 1993, Cur. Op. Immunol 5:732-9; and Gruber et al.,1996, Spring Sem Immunopath 18:243-51). This method first requires the identification of specific epitopes for each cancer type. Such candidate epitopes must be expressed at high levels on the cancer cells compared to normal tissue. Second, this method requires the development of high affinity mAbs specific for these epitopes and these mAbs must show minimal cross-reactivity with self tissue. The biological mechanism of killing with mAbs will be variable, depending upon the epitopes identified on the cancer cells, and the effector functions of the specific mAb isotype. However, due to antigenic modulation and/or mutation, the cancer cells may reduce the available levels of the target epitope per cell, or eliminate it from their surface altogether. Thus, the use of mAbs in cancer diagnosis and treatment remains problematic.

A more widely applicable approach to treatment of cancer with mAbs would be to identify a ubiquitous antigenic site, present on virtually all cancer cells, and then to develop a panel of mAbs specific for this antigen. A voluminous literature reveals that cancer cells share certain common characteristics. Many types of human cancer cells are characterized by substantial abnormalities in the glycosylation patterns of their cell-surface proteins and lipids (Hakomori et. al., 1996, Canc Res. 56:5309-18; Castronovo et al.,1989, J Nat Canc Inst 81:212-6; Springer et al.,1984, Science 224:1198-206; and Springer et al., 1997, J Mol Med 75:594-602). These differences have led to the identification of antigenic determinants on cancer cells which are expressed at far lower levels on normal cells. Natural IgM antibodies to these epitopes are present in the circulation, and the interaction of such IgM antibodies with these cancer cell surface antigens leads to activation of complement and covalent coupling of complement activation products (C3b and its fragments, collectively referred to as C3b(i)) to the tumor cells (Okada et al., 1974, Nature 248:521-25; Irie et. al., 1974, Science 186:454-456; Desai et al., 1995, J Immunol Methods 188:175-85; Vetvicka et al., 1996, J Clin Invest 98:50-61; Vetvicka et al., 1997, J Immunol 159:599-605; and Vetvicka et al., 1999, Clin Exp Immunol 115:229-35). Although relatively large amounts of C3b(i) can be deposited on cancer cells, the concomitant expression of high levels of membrane-associated complement control proteins (*e.g.*, decay accelerating factor ("DAF"), membrane cofactor protein ("MCP"), and, in particular, "protectin" *i.e.*, CD59) usually prevents complement-mediated lysis (Cheung et al., 1988, J Clin Invest 81:1122-8; Gorter

et al., 1996, Lab Invest 74:1039-49; Maenpaa et al., 1996, Am J Path 148:1139-52; and Li et al.,1997, Int J Canc 71:1049-55). Further, several investigators have established that in most cases, cancer patients have substantially *lowered* levels of the potentially protective IgM antibodies. Thus, in many cases the cancer cells cannot easily be killed by complement activation because of the reduced levels of protective IgM antibody and the increased expression of human complement control proteins on their surface.

## 2.2. ROLE OF COMPLEMENT IN INFECTIONS

Innate immunity allows humans and most animals to respond to foreign organisms even before the initiation of the immune response. One of the most important aspects of innate immunity involves the complement system (Cooper, N. R. Complement and viruses. Volanakis, J. B. and Frank, M. M. The Human Complement System in Health and Disease. 18, 393-408. (1998) New York, Marcel Dekker, Inc.; and Petry, F. and Loos, M. Bacteria and complement. Volanakis, I. E. and Frank, M. M. The Human Complement System in Health and Disease. 171, 375-392. (1998) New York, Marcel Dekker, Inc.). It is now well-documented that a wide variety of bacteria, viruses and other microorganisms activate complement in the immunologically naive individual (Peterson et al., 1978, Infect. Immun. 19:943; Verbrugh et al., 1982, J. Immunol. 129:1681; Newman et al., 1985, J. Exp. Med. 161:1414; Seelen et al., 1995, Immunol. 84:653; Wagner et al., 1998, J. Immunol. 160:1936; Bakker et al.,. 1992, AIDS 6:35; Hiavacek et al., 1999, Proc. Nat!. Acad. Sci. 96:14681; Schmitz et al., 1994, J. Immunol. 153:1352; Tacnet-Delorme et al., 1999, J. Immunol. 162:4088; Joling et al.,. 1993, J. Immunol. 150:1065; Dominguez et al., 1999, J. Exp. Med. 189:25; and Washburn et al.,1991, Molec. Immunol. 28:465). These include, but are not limited to, both gram positive and gram negative bacteria, and the virus which causes AIDS, HIV. As a consequence of complement activation, these organisms are covalently labeled with complement activation fragments, and in particular with C3b(i). Moreover, in individuals with previous exposure to these pathogens (either through immunization or previous infection), specific antibodies will bind to the pathogens and also activate complement and promote C3b(i) deposition. Although in many instances this complement activation ultimately leads to the clearance and destruction of the microorganism, in some cases the C3b(i)-labeled invader remains in the circulation and can still infect susceptible tissues and organs. In fact, there are many examples of microorganisms which actually use these covalently attached C3b(i) molecules to gain entry into cells (which have receptors for C3bCi)) and establish productive infections (Bakker et al., 1992, AIDS 6:35; Tacnet-Delorme et al., 1999, J. Immunol. 162:4088; Cooper, N. R.

Complement and viruses. Volanakis, J. B. and Frank, M. M. The Human Complement System in Health and Disease. 18, 393-408. 1998. New York, Marcel Dekker, Inc.; and Petry, F. and Loos, M. Bacteria and complement. Volanakis, I. E. and Frank, M. M. The Human Complement System in Health and Disease. 171, 375-392. (1998) New York, Marcel Dekker, Inc.). Several lines of evidence indicate that C3b(i)-opsonized HIV can persist in the body bound to the surface of dendritic cells for very long periods of time, and this cell-bound HIV may represent one of the main obstacles to the permanent elimination of HIV from the body (Hiavacek et al., 1999, Proc. Nat!. Acad. Sci. 96:14681; and Schmitz, et al.,. 1994,. J. Immunol. 153:1352).

Citation of a reference in this section or any section of this application shall not be construed as an admission that such reference is prior art to the present invention.

## 3. SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention encompasses compositions comprising antibodies immunospecific for C3b(i) and methods for the treatment and prevention of cancer in an animal comprising administering such compositions to said animal. In particular, the present invention provides methods for treating or preventing cancer in animal comprising administering to said animal a therapeutically or prophylactically effective amount of an antibody immunospecific for C3b(i), an antibody immunospecific for C3b(i) linked (*e.g.*, covalently linked) to a second molecule (*e.g.*, an IgM antibody, an IgG antibody, a glycoprotein or a glycolipid), a nucleic acid sequence encoding an antibody immunospecific for C3b(i), or a nucleic acid sequence encoding an antibody immunospecific for C3b(i) linked (*e.g.*, covalently linked) to a second molecule. The present invention also provides methods for the treatment or prevention of cancer in an animal comprising administering to said animal IgG antibodies, IgM antibodies and/or complement components in combination with anti-C3b(i) antibodies. The present invention also provides methods for the treatment or prevention of cancer in an animal comprising administering to said animal antibodies immunospecific for one or more cancer cell antigens in combination with anti-C3b(i) antibodies.

The present invention also provides compositions comprising one or more antibodies immunospecific for C3b(i) or C3b(i) linked to a second molecule, in an amount effective for the treatment or prevention of a cancer in an animal. The present invention also provides compositions comprising one or more nucleic acid molecules encoding one or more antibodies immunospecific for C3b(i) or C3b(i) linked to a second molecule, in an amount effective for the treatment or prevention of cancer in an animal. The present

invention further provides a composition comprising one or more bispecific antibodies which are immunospecific for C3b(i) or C3b(i) linked to a second molecule and an effector cell receptor or antigen, in an amount effective for the treatment or prevention of cancer.

### 3.1. DEFINITIONS

The term "C3b(i)" as used herein refers to C3b and its fragments, including, but not limited to, C3b(i), C3b, and C3d. In certain embodiments,"C3b(i)" refers to C3b. In other embodiments, "C3b(i)" refers to C3b(i). In yet other embodiments, "C3b(i)" does not refer to C3dg or the fragment of C3b or C3b(i) which corresponds to C3dg.

As used herein, the terms "antibody immunospecific for C3b(i)", "antibodies immunospecific for C3b(i)", "C3b(i) specific antibodies", "anti-C3b(i) antibodies" and the like refer one or more antibodies that specifically bind to C3b(i), a fragment of C3b(i), C3b(i) linked (*e.g.*, covalently linked) to a second molecule, or a fragment of C3b(i) linked (*e.g.*, covalently linked) to a second molecule and do not non-specifically bind to polypeptides unrelated to C3b(i). Anti-C3b(i) antibodies may cross-react with other, non-C3b(i) antigens. Preferably, anti-C3b(i) antibodies do not cross-react with other antigens. Anti-C3b(i) antibodies can be identified, for example, by immunoassays or other techniques known to those of skill in the art. In a preferred embodiment, anti-C3b(i) antibodies immunospecifically bind to C3b(i) covalently linked to a second molecule. In another preferred embodiment, anti-C3b(i) antibodies preferentially bind to C3b(i)-opsonized cancer cells, and not to C3b(i) in the milieu. In another preferred embodiment, anti-C3b(i) antibodies preferentially bind to C3b(i) deposited on viruses or microbes, and not C3b(i) in the milieu.

In certain embodiments, the "second molecule" that C3b(i) is linked to is IgG or IgM. In certain other embodiments, the "second molecule" that C3b(i) is linked to is a cancer cell antigen such as, *e.g.*, a protein, glycoprotein, peptide, polypeptide, or glycolipid differentially or preferentially expressed by cancer cells. In certain other embodiments, the "second molecule" that C3b(i) is linked to is a microbial or viral antigen. Preferably, C3b(i) is covalently linked to a second molecule.

The term "antibodies immunospecific for one or more cancer antigens, viral antigens, or microbial antigens" and the like as used herein refer to antibodies thereof that immunospecifically bind to cancer antigens, viral antigens, or microbial antigens and do not non-specifically bind to other polypeptides. Antibodies that immunospecifically bind to cancer antigens, viral antigens, or microbial antigens may have cross-reactivity with other antigens. Preferably, antibodies that immunospecifically bind to cancer antigens, viral

antigens, or microbial antigens do not cross-react with other antigens. Antibodies that immunospecifically bind to cancer antigens, viral antigens, or microbial antigens can be identified, for example, by immunoassays or other techniques known to those of skill in the art.

The term "fragment" as used herein refers to a peptide or polypeptide comprising an amino acid sequence of at least 5 contiguous amino acid residues, at least 10 contiguous amino acid residues, at least 15 contiguous amino acid residues, at least 20 contiguous amino acid residues, at least 25 contiguous amino acid residues, at least 40 contiguous amino acid residues, at least 50 contiguous amino acid residues, at least 60 contiguous amino residues, at least 70 contiguous amino acid residues, at least contiguous 80 amino acid residues, at least contiguous 90 amino acid residues, at least contiguous 100 amino acid residues, at least contiguous 125 amino acid residues, at least 150 contiguous amino acid residues, at least contiguous 175 amino acid residues, at least contiguous 200 amino acid residues, or at least contiguous 250 amino acid residues of the amino acid sequence of a cancer cell peptide or polypeptide (*e.g.*, a peptide or polypeptide preferentially or differentially expressed on a cancer cell), a viral peptide or polypeptide, a microbial peptide or polypeptide or an antibody that immunospecifically binds to C3b(i).

The term "fusion protein" as used herein refers to a polypeptide that comprises an amino acid sequence of an antibody or fragment thereof and an amino acid sequence of a heterologous polypeptide (*i.e.*, an unrelated polypeptide).

The term "host cell" as used herein refers to the particular subject cell transfected with a nucleic acid molecule and the progeny or potential progeny of such a cell. Progeny of such a cell may not be identical to the parent cell transfected with the nucleic acid molecule due to mutations or environmental influences that may occur in succeeding generations or integration of the nucleic acid molecule into the host cell genome.

An "isolated" or "purified" antibody or polypeptide is substantially free of cellular material or other contaminating proteins from the cell or tissue source from which the protein is derived, or substantially free of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized. The language "substantially free of cellular material" includes preparations of an antibody or a polypeptide in which the antibody or polypeptide is separated from cellular components of the cells from which it is isolated or recombinantly produced. Thus, an antibody or a polypeptide that is substantially free of cellular material includes preparations of antibody or polypeptide having less than about 30%, 20%, 10%, or 5% (by dry weight) of heterologous protein (also referred to herein as a "contaminating protein"). When the antibody or polypeptide is recombinantly produced, it is also preferably

substantially free of culture medium, *i.e.*, culture medium represents less than about 20%, 10%, or 5% of the volume of the protein preparation. When the antibody or polypeptide is produced by chemical synthesis, it is preferably substantially free of chemical precursors or other chemicals, *i.e.*, it is separated from chemical precursors or other chemicals which are involved in the synthesis of the protein. Accordingly such preparations of the antibody or polypeptide have less than about 30%, 20%, 10%, 5% (by dry weight) of chemical precursors or compounds other than the antibody or polypeptide fragment of interest. In a preferred embodiment, antibodies of the invention are isolated or purified.

An "isolated" nucleic acid molecule is one which is separated from other nucleic acid molecules which are present in the natural source of the nucleic acid molecule. Moreover, an "isolated" nucleic acid molecule, such as a cDNA molecule, can be substantially free of other cellular material, or culture medium when produced by recombinant techniques, or substantially free of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized. In a preferred embodiment, nucleic acid molecules encoding antibodies of the invention are isolated or purified.

In certain embodiments of the invention, a "prophylactically effective amount" is the amount of a composition of the invention that reduces the incidence of cancer, viral infection, microbial infection, or septic shock in an animal. Preferably, the incidence of cancer, viral infection, microbial infection or septic shock in an animal is reduced by at least 2.5 %, at least 5 %, at least 10 %, at least 15%, at least 25 %, at least 35 %, at least 45%, at least 50 %, at least 75%, at least 85 %, by at least 90 %, at least 95 %, or at least 99 % in an animal administered a composition of the invention relative to an animal or group of animals (*e.g.*, two, three, five, ten or more animals) not administered a composition of the invention.

In certain embodiments of the invention, a "therapeutically effective amount" is the amount of a composition of the invention that reduces the severity, the duration and/or the symptoms associated with cancer, viral infection, microbial infection, or septic shock in an animal. In certain other embodiments of the invention, a "therapeutically effective amount" is the amount of a composition of the invention that results in a reduction in viral titer or microbial titer by at least 2.5 %, at least 5 %, at least 10 %, at least 15%, at least 25 %, at least 35 %, at least 45%, at least 50 %, at least 75%, at least 85 %, by at least 90 %, at least 95 %, or at least 99 % in an animal administered a composition of the invention relative to the viral titer or microbial titer in an animal or group of animals (*e.g.*, two, three, five, ten or more animals) not administered a composition of the invention. In certain other embodiments, a "therapeutically effective amount" is the amount of a composition of the

invention that results in a reduction of the growth or spread of cancer by at least 2.5 %, at least 5 %, at least 10 %, at least 15%, at least 25 %, at least 35 %, at least 45%, at least 50 %, at least 75%, at least 85 %, by at least 90 %, at least 95 %, or at least 99 % in an animal administered a composition of the invention relative to the growth or spread of cancer in an animal or group of animals (*e.g.*, two, three, five, ten or more animals) not administered a composition of the invention.

## 4. BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIG. 1 (A-D). Representative flow cytometry data from a study with serum from a normal donor (A, B) and a cancer patient (C, D). Measurement of C3b(i) (A, C) and IgM (B, D) deposition on C4-2 human prostate cancer cells is shown. Abundant C3b(i) is deposited on C4-2 cancer cells in response to the addition of normal human serum; this opsonization appears to be facilitated by both the classical and alternative complement pathways. After opsonization with serum from a prostate cancer patient, significantly less C3b(i) and IgM are deposited on the tumor cells (C, D). C3b(i) deposition via the alternative pathway (serum with Mg-EGTA), however, is comparable for both the normal and cancer patient serum, suggesting that the alternative pathway of the complement system remains intact in prostate cancer patient serum.

FIG. 2 (A-B). Flow cytometry (A) and radioimmunoassay (B) data demonstrating that removal of IgM from AB-positive serum results in a large reduction in the amount of C3b(i) that is deposited on LNCaP (A) or C4-2 (B) cells. C3b(i) deposition can be restored with either whole normal human plasma (A, B) (e.g., plasma / IgM-depleted serum), which provides a source of human IgM, or with purified IgM/IgM-depleted serum (B).

FIG. 3 (A-B). Radioimmunoassay data demonstrating that complement activation generates between 50,000 and 500,000 C3b(i) epitopes/opsonized cancer cell (net binding, background subtracted), as defined by binding of both $^{125}$I-labeled mAb 7C12 and 3E7. In panel A, an AB-positive serum was used for opsonization and, after three washes, cells were probed with differing amounts of the two mAb. Alternatively, mAb 3E7 was added to the cells just before the serum, and was present during opsonization. In panel B, AB-positive serum was used in conjunction with the 1-μg/ml and 10-μg/ml probes, and an AB-positive citrated plasma (different donor from that in A) was used for the 3-μg/ml probes

FIG. 4. Flow cytometry results from surveys of sera from normal donors and patients with prostate cancer. Binding of human immunoglobulin to LNCaP and C4-2 prostate cancer cells was measured. Significant differences were determined by t-tests.

FIG. 5 (A-B). Immunohistochemical staining of normal (A) and neoplastic (B) human prostate tissue after incubation with anti-C3b(i) mAb.

FIG. 6. Rosetting experiment using erythrocytes and opsonized LNCaP prostate cancer cells incubated in plasma in the presence of an anti-CR1 X anti-C3b(i) bispecific monoclonal antibody complex (7G9 X 3E7).

FIG. 7 (A-B). *In vitro* killing of LNCaP (A) and C4-2 (B) prostate cancer cells using $^{131}$I-labeled mAbs. Dashed line (----) delineates normal serum opsonized cells treated with $^{131}$I-labeled irrelevant mAbs; dotted line (....) delineates non-opsonized cells treated with $^{131}$I-anti-Cb3(i) mAbs; solid line (—) delineates normal serum opsonized cells treated with $^{131}$I-labeled anti-C3b(i) mAbs. Measured as cell proliferation relative to non-treated cells.

FIG. 8. The schematic illustrates the steps of the invention, all of which occur on the cell surface of tumor cells within the body of the cancer patient. In the first step, human IgM (either endogenous, or infused into the patient) binds to specific sites on the cancer cell. In the second step, complement (either endogenous, or infused into the patient as fresh plasma) is activated, and the resulting proteolytic fragment C3b(i) is deposited on the surface of the cancer cell. In the third step, a mAb specific for the C3b(i) epitope is administered. The mAb can be associated with a toxic, enzymatic, genetic, differentiating, and/or imaging agent (therefore it is an "effector mAb"), which results in the destruction or imaging of the cancer cell.

FIG. 9. Red cell binding experiment using erythrocytes and opsonized Rajii cells. Rajii cells treated with: serum alone; EDTA treated serum alone; serum and Rituximab; EDTA treated serum and Rituximab; serum and anti-C3b(i) X anti-CR1 bispecific monoclonal antibody complexes; EDTA treated serum and anti-C3b(i) X anti-CR1 bispecific monoclonal antibody complexes; serum, Rituximab, and anti-C3b(i) X anti-CR1 bispecific monoclonal antibody complexes; and EDTA treated serum Rituximab, and anti-C3b(i) X anti-CR1 bispecific monoclonal antibody complexes.

FIG. 10. Red cell binding experiment using erythrocytes and opsonized Rajii cells. Rajii cells treated with: washed whole blood reconstituted serum alone; washed whole blood reconstituted serum and Rituximab; washed whole blood reconstituted serum and anti-C3b(i) X anti-CR1 bispecific monoclonal antibody complexes; and washed whole blood reconstituted serum, Rituximab, and anti-C3b(i) X anti-CR1 bispecific monoclonal antibody complexes; washed whole blood reconstituted serum, Rituximab (15'), and anti-C3b(i) X anti-CR1 bispecific monoclonal antibody complexes; and washed whole blood

reconstituted serum, anti-C3b(i) X anti-CR1 bispecific monoclonal antibody (15'), and Rituximab.

## 5. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention encompasses compositions comprising one or more antibodies immunospecific for C3b(i) and the use of such compositions in the treatment and prevention of cancer, viral infection, microbial infection, and septic shock. The present invention provides methods for treating or preventing cancer, viral infection, microbial infection, or septic shock in an animal, said methods comprising administering to said animal a therapeutically or prophylactically effective amount of one or more antibodies immunospecific for C3b(i) or C3b(i) linked to a second molecule. The present invention provides methods for treating or preventing cancer, viral infection, microbial infection, or septic shock in an animal, said methods comprising administering to said animal IgG antibodies, IgM antibodies, and/or one or more complement components in combination with a therapeutically or prophylactically effective amount of one or more antibodies immunospecific for C3b(i) or C3b(i) linked to a second molecule. The present invention also provides methods for treating or preventing cancer, viral infection, or microbial infection in an animal, said methods comprising administering to said animal one or more antibodies immunospecific for one or more cancer antigens, viral antigens, or microbial antigens, respectively, in combination with one or more antibodies immunospecific for C3b(i) or C3b(i) linked to a second molecule. The present invention further provides methods for treating or preventing septic shock in an animal, said methods comprising administering to said animal one or more antibodies immunospecific for lipopolysaccharide (LPS), an endotoxin, or a constituent of the outer wall of a gram negative bacteria (*e.g.*, the outer wall of *E. coli*) in combination with one or more antibodies immunospecific for C3b(i) or C3b(i) linked to a second molecule.

In accordance with the present invention, antibodies immunospecific for C3b(i) are administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, to treat or prevent cancer, viral infection, microbial infection, or septic shock. The antibodies of the present invention comprise monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, bispecific antibodies, humanized antibodies, human antibodies, chimeric antibodies, single chain antibodies, sFvs, idiotypic antibodies, Fab fragments, and F(ab') fragments, fragments produced by a Fab expression library, and epitope-binding fragments. In a specific embodiment, monoclonal antibodies immunospecific for C3b(i) are administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, to treat or prevent cancer, viral infection, microbial infection, or septic shock. In a preferred embodiment, monoclonal

antibodies immunospecific for C3b(i) covalently linked to a second molecule (*e.g.*, an IgM antibody, an IgG antibody, a glycoprotein or glycolipid) are administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, to treat or prevent cancer, viral infection, microbial infection, or septic shock. In another embodiment, monoclonal antibodies immunospecific for C3b(i) are conjugated to a therapeutic moiety such as an antibiotic, a chemotherapeutic cytotoxin, *e.g.*, a cytostatic or cytocidal agent (*e.g.*, paclitaxol, cytochalasin B or diphtheria toxin), a thrombotic or anti-angiogenic agent or a radioactive label. In another embodiment, monoclonal antibodies immunospecific for C3b(i) are conjugated to a detectable substrate such as, *e.g.*, an enzyme, fluorescent marker, luminescent material, bioluminescent material, or radioactive material. In yet another embodiment, the valency of monoclonal antibodies immunospecific for C3b(i) are increased to that, for example, of a dimer or an IgM-like pentamer.

In a preferred embodiment, bispecific antibodies which are immunospecific for C3b(i) and an effector cell receptor or antigen are administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, to treat, or prevent cancer, viral infection, microbial infection, or septic shock. The term "effector cell" as used herein refers to a cell which is involved in a cell-mediated immune response. Examples of effector cells include, but are not limited to, monocytes, macrophages, dendritic cells, neutrophils, natural killer cells, lymphocytes and erythrocytes. In one embodiment, anti-C3b(i) heteropolymer constructs (bispecific monoclonal complexes) bound *ex vivo* to an effector cell via a cell surface receptor are administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, to treat or prevent cancer, viral infection or microbial infection. Cell surface receptors include, but are not limited to, CR1, CR2, CR3, CR4, human Fcγ receptors CD16, CD32 and CD64, and the Fc receptor for IgA, CD89. In a preferred embodiment, anti-C3b(i) heteropolymer constructs bound *ex vivo* to erythrocytes via CR1 are administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, to treat, inhibit or prevent cancer, viral infection, microbial infection, or septic shock.

In a preferred embodiment, bispecific diabodies which are antibody fragments immunospecific for C3b(i) and a complement component are administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, to treat or prevent cancer, viral infection, microbial infection, or septic shock. In accordance with this embodiment, the diabodies are capable of recruiting complement components. In another embodiment, bispecific diabodies which are immunospecific for C3b(i) and C1q are administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, to treat or prevent cancer, viral

infection, microbial infection, or septic shock. Methods of preparing diabodies are taught in U.S. Patent No. 5,837,242, which is incorporated herein in its entirety.

The present invention encompasses the administration of IgG antibodies and/or IgM antibodies in combination with one or more anti-C3b(i) antibodies to animals to facilitate the opsonization of cancer cells, viruses, and microbes. In one embodiment, IgG antibodies and/or IgM antibodies are administered to an animal prior to, subsequent to, or concomitantly with the administration of one or more antibodies immunospecific for C3b(i) to treat or prevent cancer, viral infection, microbial infection, or septic shock. In a preferred embodiment, IgG antibodies and/or IgM antibodies are administered to an animal prior to the administration of one or more antibodies immunospecific for C3b(i) to treat or prevent cancer, viral infection, microbial infection or septic shock. In a specific embodiment, one or more antibodies immunospecific for one or more cancer cell antigens are administered to an animal prior to, subsequent to, or concomitantly with the administration of one or more antibodies immunospecific for C3b(i), in an amount effective for the treatment or prevention cancer. In a preferred embodiment, one or more antibodies immunospecific for one or more cancer cell antigens are administered to an animal prior to the administration of one or more antibodies immunospecific for C3b(i), in an amount effective for the treatment or prevention cancer. Examples of cancer cell antigens include, but are not limited to, improperly glycosylated cell-surface proteins and lipids.

In a specific embodiment, one or more antibodies used in cancer immunotherapy are administered to an animal prior to, subsequent to, or concomitantly with the administration of one or more anti-C3b(i) antibodies, in an amount effective for the treatment or prevention cancer. In a preferred embodiment, one or more antibodies used in cancer immunotherapy are administered to an animal prior to the administration of one or more anti-C3b(i) antibodies, in an amount effective for the treatment or prevention cancer. Examples of antibodies used in cancer immunotherapy include, but are not limited to: Herceptin® (Trastuzumab; Genetech, CA) which is a humanized anti-HER2 monoclonal antibody for the treatment of patients with metastatic breast cancer; Retuxan® (rituximab; Genentech) which is a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody for the treatment of patients with non-Hodgkin's lymphoma; OvaRex (AltaRex Corporation, MA) which is a murine antibody for the treatment of ovarian cancer; Panorex (Glaxo Wellcome, NC) which is a murine $IgG_{2a}$ antibody for the treatment of colorectal cancer; BEC2 (ImClone Systems Inc., NY) which is murine IgG antibody for the treatment of lung cancer; IMC-C225 (Imclone Systems Inc., NY) which is a chimeric IgG antibody for the treatment of head and neck cancer; Vitaxin (MedImmune, Inc., MD) which is a humanized antibody for the treatment of sarcoma;

Campath I/H (Leukosite, MA) which is a humanized $IgG_1$ antibody for the treatment of chronic lymphocytic leukemia (CLL); Smart MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA) which is a humanized IgG antibody for the treatment of acute myeloid leukemia (AML); LymphoCide (Immunomedics, Inc., NJ) which is a humanized IgG antibody for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma; Smart I D10 (Protein Design Labs, Inc., CA) which is a humanized antibody for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma; Oncolym (Techniclone, Inc., CA) which is a murine antibody for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma; the monoclonal antibody 7E11 which immunospecifically binds to prostate-specific membrane antigen (PSMA; Lin et al., 1997, Cancer Res. 57:3629); and the anti-CD20 monoclonal antibody sold by Beckman Coulter, Inc., CA. In a preferred embodiment, the antibody immunospecific for a cancer cell antigen used in accordance with the invention is rituximab.

In a specific embodiment, one or more antibodies immunospecific for one or more viral or microbial antigens are administered to an animal prior to, subsequent to, or concomitantly with the administration of one or more antibodies immunospecific for C3b(i), in an amount effective for the treatment or prevention of viral or microbial infection. Examples of antibodies used for the treatment or prevention of viral or microbial infection include, but are not limited to: Synagis® (MedImmune, Inc., MD) which is a humanized anti-respiratory syncytial virus (RSV) monoclonal antibody for the treatment of patients with RSV infection; PRO542 (Progenics) which is a CD4 fusion antibody for the treatment of HIV infection; Ostavir (Protein Design Labs, Inc., CA) which is a human antibody for the treatment of hepatitis B virus; Protovir (Protein Design Labs, Inc., CA) which is a humanized $IgG_1$ antibody for the treatment of cytomegalovirus (CMV); WIN1 which immunospecifically binds to LPS (Novardis) and mouse monoclonal anti-Legionella Pneumonia LPS (Research Diagnostics, Inc. NJ).

The present invention encompasses the administration of plasma as a source of IgG and/or IgM antibodies and one or more anti-C3b(i) antibodies for the treatment or prevention of cancer, viral infection, and microbial infection. In a specific embodiment, plasma or selectively enriched IgG and/or IgM antibodies is administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, prior to, subsequent to, or concomitantly with the administration of one or more anti-C3b(i) antibodies in an amount effective for the treatment or prevention of cancer, viral infection or microbial infection. The plasma or selectively enriched IgG and/or IgM antibodies may be obtained from normal animals or from animals with a particular type of cancer, a particular type viral infection, or a particular type of microbial infection.

Preferably, the plasma or selectively enriched IgG and/or IgM is obtained from an animal of the same species which receives the administration. The plasma may or may not be treated with EDTA, citrate or heparin to block the complement pathways. In a specific embodiment, plasma or selectively enriched IgG and/or IgM antibodies from an animal, which contains antibodies immunospecific for cancer cell antigens (*e.g.*, improperly glycosylated proteins or lipids) are administered to an animal prior to the administration of anti-C3b(i) antibodies. In another specific embodiment, plasma or selectively enriched IgG and/or IgM antibodies from an animal, which contains antibodies immunospecific for a viral antigen or a microbial antigen (*e.g.*, anti-HIV gp120 antibodies or anti-LPS antibodies) are administered to an animal prior to the administration of anti-C3b(i) antibodies.

The present invention encompasses the administration of recombinant complement components or plasma as a source of complement components and one or more anti-C3b(i) antibodies for the treatment or prevention of cancer, viral infection, microbial infection, and septic shock In a specific embodiment, one or more complement components or recombinant complement components are administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, prior to, subsequent to, or concomitantly with the administration of antibodies immunospecific for C3b(i) in an amount effective for the treatment or prevention of cancer, viral infection, microbial infection, or septic shock. In another embodiment, normal plasma as a source of complement components is administered to an animal prior to, subsequent to, or concomitantly with the administration of antibodies immunospecific for C3b(i) in an amount effective for the treatment or prevention of cancer, viral infection, microbial infection, or septic shock.

In a specific embodiment, a source of IgG and/or IgM antibodies and complement components (*e.g.*, normal plasma) is administered to an animal to insure efficient opsonization prior to the administration of antibodies specific for C3b(i). In accordance with the invention, the administration of C3b(i) immunospecific antibodies in combination with IgG antibodies, IgM antibodies and/or complement components will initiate a chain reaction which results in increased complement activity and ultimately the killing of cancerous cells.

In a preferred embodiment, the endogenous levels of IgG antibodies, IgM antibodies and/or complement components are analyzed to determine whether an animal, preferably a mammal and most preferably a human, requires the administration of IgG antibodies, IgM antibodies and/or complement components. Standard techniques known to those of skill in the art can be utilized to measure the endogenous levels of IgG antibodies, IgM antibodies and complement components in an animal's sera. For example, the level of IgM antibodies

or IgG antibodies in sera can be determined by titration of the sera against cell lines such as comparable cancer cell lines. Further, the level of complement components and complement activity can be determined by, for example, *in vitro* tests for the ability to interact with complement proteins and the ability to lyse target cells opsonized with specific antibodies (Complement: A Practical Approach, Dodds and Sim, Oxford University Press 1997; Makrides et al., 1992, J. Biol. Chem. 264:24754-2476; and Weisman, H. F., et al., 1990, Science, 244:146-151). The present invention also provides compositions comprising one or more anti-C3b(i) antibodies for use in the treatment, prevention, detection or diagnosis of cancer, viruses, and microbes.

The present invention provides methods and kits for depleting cancerous cells *in vitro* utilizing C3b(i) specific antibodies. The invention also provides methods and kits for the detection, imaging, and diagnosis of cancer utilizing antibodies specific for C3b(i). Further, the invention provides pharmaceutical compositions comprising antibodies specific for C3b(i).

### 5.1. IgG AND IgM ENRICHMENT

In accordance with certain embodiments of the present invention, the levels of IgG antibodies, IgM antibodies, and complement components in the sera or plasma of an animal are measured prior to the administration of anti-C3b(i) antibodies. In one embodiment, animals determined to have low levels of IgG antibodies and/or IgM antibodies are administered normal plasma containing IgG antibodies and/or IgM antibodies (preferably, IgG antibodies or IgM antibodies that immunospecifically bind to one or more cancer cell epitopes (*e.g.*, improperly glycosylated proteins or lipids expressed by cancer cells), viral epitopes, or microbial epitopes) prior to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week before), subsequent to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week after), or concomitantly with the administration of anti-C3b(i) antibodies for the treatment or prevention of cancer, viral infection, or microbial infection. In accordance with this embodiment, the plasma is obtained from an animal of the same species that receives the plasma. In another embodiment, animals determined to have low levels of IgM antibodies are administered plasma enriched for IgM antibodies prior to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week before), subsequent to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week after), or concomitantly

with the administration of anti-C3b(i) antibodies for the treatment or prevention of cancer, viral infection, or microbial infection. In another embodiment, animals determined to have low levels of IgG antibodies are administered plasma enriched for IgG antibodies prior to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week before), subsequent to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week after), or concomitantly with the administration of anti-C3b(i) antibodies for the treatment or prevention of cancer, viral infection, or microbial infection. In accordance with these embodiments, IgM antibodies or IgG antibodies are selectively enriched utilizing standard techniques known to those of skill in the art. Such techniques include, but are not limited to, chromatography, centrifugation, and differential solubility.

In a particular embodiment of the invention, native or recombinant IgG antibodies or IgM antibodies known to immunospecifically bind to cancer cells, viruses or microbes are administered to an animal prior to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week before), subsequent to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week after), or concomitantly with the administration of anti-C3b(i) antibodies for the treatment or prevention of cancer. IgG antibodies or IgM antibodies that immunospecifically bind to one or more cancer cell antigens (*e.g.*, improperly glycosylated proteins or lipids expressed by cancer cells), viral antigens (*e.g.*, glycoprotein F of RSV and gp120 of HIV), or microbial antigens (*e.g.*, LPS) can be purchased from a company or purified utilizing standard protein purification techniques known to those of skill in the art. Examples of standard protein purification techniques include, but are not limited to, gel purification, chromatography (*e.g.*, ion exchange, affinity, particularly by affinity for the specific antigen after Protein A, and sizing column chromatography), centrifugation, and differential solubility. Recombinant IgG antibodies and IgM antibodies can be produced utilizing standard techniques known to those of skill in the art.

In one embodiment, plasma as a source of IgG and IgM antibodies is administered to an animal the same day as the animal is administered antibodies immunospecific for C3b(i) or C3b(i) covalently linked to a second molecule for the treatment or prevention of cancer, viral infections or microbial infections. In another embodiment, plasma as a source of IgG and IgM antibodies is administered to an animal a few minutes or hours (*e.g.*, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours) before the antibodies immunospecific for C3b(i) or C3b(i) covalently linked to a second molecule are

administered to the animal for the treatment or prevention of cancer, viral infections or microbial infections.

In a preferred embodiment, IgG antibodies and/or IgM antibodies are administered to an animal the same day as the animal is administered antibodies immunospecific for C3b(i) or C3b(i) covalently linked to a second molecule for the treatment or prevention of cancer, viral infections or microbial infections. In another preferred embodiment, IgG antibodies and/or IgM antibodies are administered to an animal a few minutes or hours (*e.g.*, 5 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours or 12 hours) before administering antibodies immunospecific for C3b(i) or C3b(i) covalently linked to a second molecule for the treatment or prevention of cancer, viral infections or microbial infections.

### 5.2. COMPLEMENT COMPONENTS

In a preferred embodiment, animals determined to have low levels of complement, particularly C3, are infused with normal plasma prior to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week before), subsequent to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week after), or concomitantly with the administration of anti-C3b(i) antibodies for the treatment or prevention of cancer, viral infection, or microbial infection. In accordance with this embodiment, the plasma is obtained from an animal of the same species that receives the plasma. In another preferred embodiment, animals determined to have low levels of complement are administered native or recombinant complement proteins (*e.g.*, C3) prior to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week before), subsequent to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week after), or concomitantly with the administration of anti-C3b(i) antibodies for the treatment or prevention of cancer, viral infection, or microbial infection. In a specific embodiment, one or more complement components are administered to an animal the same day as the animal is administered anti-C3b(i) antibodies for the treatment or prevention of cancer, viral infection, or microbial infection. In another embodiment, one or more complement components are administered to an animal a few hours (*e.g.*, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours or 12 hours) before administering antibodies anti-C3b(i) antibodies for the treatment or prevention of cancer, viral infection, or microbial infection.

Complement components, in particular complement component C3, can be purchased from a company or purified utilizing standard protein purification techniques

known to those of skill in the art. Examples of such purification techniques include, but are not limited to, gel purification, chromatography (*e.g.*, ion exchange, affinity, particularly by affinity for the specific antigen after Protein A, and sizing column chromatography), centrifugation, and differential solubility. Recombinant complement components (*e.g.*, C3) can be produced utilizing standard techniques known to those of skill in the art. In accordance with the invention, the nucleic acid sequences encoding complement components can be obtained from available sequence databases, *e.g.*, GenBank. Both cDNA and genomic sequences can be cloned and expressed. Further, in accordance with the invention, the native or recombinant complement components administered to an animal for the treatment or prevention of cancer, viral infection, or microbial infection retain the ability to function in the classical and/or alternative complement pathways.

The nucleotide sequence encoding complement components or a functionally active analogs or other derivatives thereof (*e.g.*, C3) can be inserted into an appropriate expression vector, *i.e.*, a vector which contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted protein-coding sequence. For example, the nucleotide sequence encoding human C3 as disclosed in Genbank Accession Numbers NM_000064 and K02765 can be inserted into an appropriate expression vector. In another example, the nucleotide sequence encoding human C1 subcomponents, human C2 or human C2 as disclosed in Genbank Accession Numbers NM_000063, NM_001734, J04080, and AF019413, respectively, can be inserted into an appropriate expression vector. The necessary transcriptional and translational signals can be supplied by the native complement component genes or its flanking regions. A variety of host-vector systems may be utilized to express the protein-coding sequence. These include, but are not limited to, mammalian cell systems infected with virus (*e.g.*, vaccinia virus, adenovirus, etc.); insect cell systems infected with virus (*e.g.*, baculovirus); and microorganisms such as yeast containing yeast vectors, or bacteria transformed with bacteriophage, DNA, plasmid DNA, or cosmid DNA. The expression elements of vectors vary in their strengths and specificities. Depending on the host-vector system utilized, any one of a number of suitable transcription and translation elements may be used. In specific embodiments, the human complement component genes or sequences encoding functionally active portions of the human complement components are expressed.

Any of the methods known to one of skill in the art for the insertion of DNA fragments into a vector may be used to construct expression vectors containing a chimeric gene consisting of appropriate transcriptional and translational control signals and the protein coding sequences. These methods may include *in vitro* recombinant DNA and

synthetic techniques and *in vivo* recombinants (genetic recombination). The expression of a nucleic acid sequence encoding a complement component or fragments thereof may be regulated by a second nucleic acid sequence so that the complement component or fragments thereof are expressed in a host transformed with the recombinant DNA molecule. The expression of complement components (*e.g.*, C3) may be controlled by any promoter or enhancer element known to one of skill in the art. In particular, the expression of a complement component may regulated by any constitutive promoter, inducible promoter, tissue specific promoter, or native complement component promoter known to one of skill in the art.

Promoters which may be used to regulate the expression of a complement component (*e.g.*, C3) include, but are not limited to, viral promoters such as the SV40 early promoter region (Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310), the promoter contained in the 3' long terminal repeat of Rous sarcoma virus (Yamamoto, et al., 1980, Cell 22:787-797), the herpes thymidine kinase promoter (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441-1445), the regulatory sequences of the metallothionein gene (Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42); prokaryotic promoters such as the β-lactamase promoter (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3727-3731), or the *tac* promoter (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25); see also "Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American, 1980, 242:74-94; plant promoters such as the nopaline synthetase promoter region (Herrera-Estrella et al., Nature 303:209-213) or the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter (Gardner et al., 1981, Nucl. Acids Res. 9:2871), and the promoter of the photosynthetic enzyme ribulose biphosphate carboxylase (Herrera-Estrella et al., 1984, Nature 310:115-120); promoter elements from yeast or other fungi such as the Gal 4 promoter, the ADC (alcohol dehydrogenase) promoter, PGK (phosphoglycerol kinase) promoter, alkaline phosphatase promoter; and the following animal transcriptional control regions, which exhibit tissue specificity and have been utilized in transgenic animals: elastase I gene control region which is active in pancreatic acinar cells (Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515), insulin gene control region which is active in pancreatic beta cells (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122), immunoglobulin gene control region which is active in lymphoid cells (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444), mouse mammary tumor virus control region which is active in testicular, breast, lymphoid and mast cells (Leder et al., 1986, Cell 45:485-495), albumin gene control region which is active in liver

(Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276), alpha-fetoprotein gene control region which is active in liver (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 235:53-58), alpha 1-antitrypsin gene control region which is active in the liver (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171), beta-globin gene control region which is active in myeloid cells (Mogram et al., 1985, Nature 315 :338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94), myelin basic protein gene control region which is active in oligodendrocyte cells in the brain (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712), myosin light chain-2 gene control region which is active in skeletal muscle (Sani, 1985, Nature 314:283-286), and gonadotropic releasing hormone gene control region which is active in the hypothalamus (Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378). In certain embodiments, the promoter regulating the expression of the complement component is a constitutive promoter. In certain other embodiments, the promoter regulating the expression of the complement component is an inducible or tissue-specific promoter.

In a specific embodiment, the vector used to express a complement component comprises a promoter operably linked to a complement component (*e.g.*, C3)-encoding nucleic acid, one or more origins of replication, and, optionally, one or more selectable markers (*e.g.*, an antibiotic resistance gene).

Expression vectors containing nucleotide sequences encoding one or more complement components can be identified by three general approaches: (a) nucleic acid hybridization; (b) presence or absence of "marker" gene functions; and (c) expression of inserted sequences. In the first approach, the presence of a nucleotide sequence encoding a complement component (*e.g.*, C3) in an expression vector(s) can be detected by nucleic acid hybridization using probes comprising sequences that are homologous to the inserted nucleotide sequence. In the second approach, the recombinant vector/host system can be identified and selected based upon the presence or absence of certain "marker" gene functions (*e.g.*, thymidine kinase activity, resistance to antibiotics, transformation phenotype, occlusion body formation in baculovirus, etc.) caused by the insertion of the nucleotide sequence encoding the complement component in the vector(s). For example, if a nucleotide sequence encoding C3 is inserted within the marker gene sequence of the vector, recombinant vectors containing the nucleotide sequence can be identified by the absence of the marker gene function. In the third approach, recombinant expression vectors can be identified by assaying for RNA or polypeptides encoded by the nucleotide sequence for the complement component. Such assays can be based, for example, on the physical or functional properties of the complement component in *in vitro* assay systems, *e.g.*, binding of C3 with anti-C3 antibody.

A host cell can be transfected with a nucleotide sequence encoding a complement component or a vector comprising a nucleotide sequence encoding a complement component using techniques known to those of skill in the art such as, for example, microinjection, electroporation, lipofection, and calcium phosphate precipitation. Host cells may be stably or transiently transfected with a nucleotide sequence encoding a complement component or a vector comprising a nucleotide sequence encoding a complement component.

For long-term, high-yield production of one or more recombinant complement components, stable expression is preferred. For example, cell lines which stably express one or more complement components may be engineered. Rather than using expression vectors which contain viral origins of replication, host cells can be transformed with DNA controlled by appropriate expression control elements (*e.g.*, promoter, enhancer, sequences, transcription terminators, polyadenylation sites, etc.), and a selectable marker. Following the introduction of the foreign DNA, engineered cells may be allowed to grow for 1-2 days in an enriched media, and then are switched to a selective media. The selectable marker in the recombinant plasmid confers resistance to the selection and allows cells to stably integrate the plasmid into their chromosomes and grow to form foci which in turn can be cloned and expanded into cell lines.

A number of selection systems may be used, including but not limited to the herpes simplex virus thymidine kinase (Wigler, et al., 1977, Cell 11:223), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (Szybalska & Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026), and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy et al., 1980, Cell 22:817) genes can be employed in tk-, hgprt- or aprt- cells, respectively. Also, antimetabolite resistance can be used as the basis of selection for dhfr, which confers resistance to methotrexate (Wigler et al., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); gpt, which confers resistance to mycophenolic acid (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); neo, which confers resistance to the aminoglycoside G-418 (Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1); and hygro, which confers resistance to hygromycin (Santerre et al., 1984, Gene 30:147) genes.

Once a suitable host system and growth conditions are established, recombinant expression vectors can be propagated and prepared in quantity. A host cell strain can be chosen which modulates the expression of the inserted sequences in the specific fashion desired. Appropriate cell lines or host systems can be chosen to ensure the desired modification and processing of the complement protein expressed. Different host cells have characteristic and specific mechanisms for the translational and post-translational

processing and modification (*e.g.*, glycosylation and phosphorylation) of proteins. For example, expression in a bacterial system can be used to produce an unglycosylated core protein product. Expression in yeast will produce a glycosylated product. Expression in mammalian cells can be used to ensure "native" glycosylation of a heterologous protein. Such mammalian host cells include, but are not limited to, 293T, CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, MT2, U937, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20, T47D, CRL7030, Hs578Bst, lymphocytes and fibroblasts. Furthermore, different vector/host expression systems may effect processing reactions to different extents.

### 5.3. ANTIBODIES

Antibodies of the invention include, but are not limited to, polyclonal, monoclonal, bispecific, human, humanized or chimeric antibodies, single chain antibodies, sFvs, Fab fragments, F(ab') fragments, fragments produced by a Fab expression library, anti-idiotypic (anti-Id) antibodies, and epitope-binding fragments of any of the above which immunospecifically bind to cancer cell antigens, viral antigens, microbial antigens, C3b(i) or fragments thereof, or C3b(i) linked to a second molecule. The term "antibody" as used herein refers to immunoglobulin molecules and immunologically active portions of immunoglobulin molecules, *i.e.*, molecules that contain an antigen binding site which immunospecifically binds a cancer cell antigen, a viral antigen, a microbial antigen, C3b(i), or C3b(i) linked (*e.g.*, covalently linked) to a second molecule. The immunoglobulin molecules of the invention can be of any type (*e.g.*, IgG, IgE, IgM, IgD and IgA ), class, or subclass of immunoglobulin molecule.

Polyclonal antibodies which may be used in the methods of the invention are heterogeneous populations of antibody molecules derived from the sera of immunized animals. Various procedures well known in the art may be used for the production of polyclonal antibodies to an antigen-of-interest. For example, for the production of polyclonal antibodies, various host animals can be immunized by injection with an antigen of interest or derivative thereof, including but not limited to rabbits, mice, rats, etc. Various adjuvants may be used to increase the immunological response, depending on the host species, and including but not limited to Freund's (complete and incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanins, dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as BCG (bacille Calmette-Guerin) and corynebacterium parvum. Such adjuvants are also well known in the art.

Monoclonal antibodies which may be used in the methods of the invention are homogeneous populations of antibodies to a particular antigen (*e.g.*, a cancer cell antigen, a viral antigen, a microbial antigen, C3b(i) or C3b(i) covalently linked to a second molecule). A monoclonal antibody (mAb) to an antigen-of-interest can be prepared by using any technique known in the art which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include, but are not limited to, the hybridoma technique originally described by Kohler and Milstein (1975, Nature 256, 495-497), the more recent human B cell hybridoma technique (Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4: 72), and the EBV-hybridoma technique (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Such antibodies may be of any immunoglobulin class including IgG, IgM, IgE, IgA, and IgD and any subclass thereof. The hybridoma producing the mAbs of use in this invention may be cultivated *in vitro* or *in vivo*.

The monoclonal antibodies which may be used in the methods of the invention include, but are not limited to, human monoclonal antibodies or chimeric human-mouse (or other species) monoclonal antibodies. Human monoclonal antibodies may be made by any of numerous techniques known in the art (*e.g.*, Teng et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 7308-7312; Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4, 72-79; and Olsson et al., 1982, Meth. Enzymol. 92, 3-16).

The invention further provides for the use of bispecific antibodies. Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditional production of full length bispecific antibodies is based on the coexpression of two immunoglobulin heavy chain-light chain pairs, where the two chains have different specificities (Milstein et al., 1983, Nature 305:537-539). Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of 10 different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. Purification of the correct molecule, which is usually done by affinity chromatography steps, is rather cumbersome, and the product yields are low.

Similar procedures are disclosed in PCT Publication No. WO 93/08829, published 13 May 1993, and in Traunecker et al., 1991, EMBO J. 10:3655-3659 .

According to a different and more preferred approach, antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) are fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2, and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy-chain constant region (CH1) containing the site necessary for light chain binding, present in at least one of the fusions.

DNAs encoding the immunoglobulin heavy chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host organism. This provides for great flexibility in adjusting the mutual proportions of the three polypeptide fragments in embodiments when unequal ratios of the three polypeptide chains used in the construction provide the optimum yields. It is, however, possible to insert the coding sequences for two or all three polypeptide chains in one expression vector when the expression of at least two polypeptide chains in equal ratios results in high yields or when the ratios are of no particular significance.

In a preferred embodiment of this approach, the bispecific antibodies are composed of a hybrid immunoglobulin heavy chain with a first binding specificity in one arm, and a hybrid immunoglobulin heavy chain-light chain pair (providing a second binding specificity) in the other arm. It was found that this asymmetric structure facilitates the separation of the desired bispecific compound from unwanted immunoglobulin chain combinations, as the presence of an immunoglobulin light chain in only one half of the bispecific molecule provides for a facile way of separation. This approach is disclosed in PCT Publication No. WO 94/04690 published March 3,1994, which is incorporated herein by reference in its entirety.

For further details of generating bispecific antibodies see, for example, Suresh et al., Methods in Enzymology,1986, 121:210. Using such techniques, a bispecific molecule which combines anti-C3b(i) antibody and an antibody specific for an effector cell receptor or antigen can be prepared for use in the treatment or inhibition of disease as defined herein.

The invention provides for the use of functionally active fragments, derivatives or analogs of antibodies which immunospecifically bind to cancer cell antigens, viral antigens, and microbial antigens. Functionally active means that the fragment, derivative or analog is able to elicit anti-anti-idiotype antibodies that recognize the same antigen that the antibody from which the fragment, derivative or analog is derived recognized. Specifically, in a preferred embodiment the antigenicity of the idiotype of the immunoglobulin molecule may be enhanced by deletion of framework and CDR sequences that are C-terminal to the CDR sequence that specifically recognizes the antigen. To determine which CDR sequences bind the antigen, synthetic peptides containing the CDR sequences can be used in binding assays with the antigen by any binding assay method known in the art (*e.g.*, the BIA core assay)

Other embodiments of the invention include fragments of the antibodies of the invention such as, but not limited to, $F(ab')_2$ fragments, which contain the variable region, the light chain constant region and the CH1 domain of the heavy chain can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule, and Fab fragments, which can be generated by

reducing the disulfide bridges of the $F(ab')_2$ fragments. The invention also provides heavy chain and light chain dimers of the antibodies of the invention, or any minimal fragment thereof such as Fvs or single chain antibodies (SCAs) (*e.g.*, as described in U.S. Patent 4,946,778; Bird, 1988, Science 242:423-42; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; and Ward et al., 1989, Nature 334:544-54), or any other molecule with the same specificity as the antibody of the invention.

Additionally, recombinant antibodies, such as chimeric and humanized monoclonal antibodies, comprising both human and non-human portions, which can be made using standard recombinant DNA techniques, are within the scope of the invention. A chimeric antibody is a molecule in which different portions are derived from different animal species, such as those having a variable region derived from a murine monoclonal and a human immunoglobulin constant region. (See, *e.g.*, Cabilly et al., U.S. Patent No. 4,816,567; and Boss et al., U.S. Patent No. 4,816397, which are incorporated herein by reference in their entirety.) Humanized antibodies are antibody molecules from non-human species having one or more complementarily determining regions (CDRs) from the non-human species and a framework region from a human immunoglobulin molecule. (See, *e.g.*, Queen, U.S. Patent No. 5,585,089, which is incorporated herein by reference in its entirety.) Such chimeric and humanized monoclonal antibodies can be produced by recombinant DNA techniques known in the art, for example using methods described in PCT Publication No. WO 87/02671; European Patent Application 184,187; European Patent Application 171,496; European Patent Application 173,494; PCT Publication No. WO 86/01533; U.S. Patent No. 4,816,567; European Patent Application 125,023; Better et al., 1988, Science 240:1041-1043; Liu et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu et al., 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura et al., 1987, Canc. Res. 47:999-1005; Wood et al., 1985, Nature 314:446-449; and Shaw et al., 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, 1985, Science 229:1202-1207; Oi et al., 1986, Bio/Techniques 4:214; U.S. Patent 5,225,539; Jones et al., 1986, Nature 321:552-525; Verhoeyan et al. (1988) Science 239:1534; and Beidler et al., 1988, J. Immunol. 141:4053-4060; each of which is incorporated herein by reference n its entirety.

Completely human antibodies are particularly desirable for therapeutic treatment of human patients. Such antibodies can be produced using transgenic mice which are incapable of expressing endogenous immunoglobulin heavy and light chains genes, but which can express human heavy and light chain genes. The transgenic mice are immunized in the normal fashion with a selected antigen, *e.g.*, all or a portion of a polypeptide of the

invention. Monoclonal antibodies directed against the antigen can be obtained using conventional hybridoma technology. The human immunoglobulin transgenes harbored by the transgenic mice rearrange during B cell differentiation, and subsequently undergo class switching and somatic mutation. Thus, using such a technique, it is possible to produce therapeutically useful IgG, IgA, IgM and IgE antibodies. For an overview of this technology for producing human antibodies, see Lonberg and Huszar (1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93). For a detailed discussion of this technology for producing human antibodies and human monoclonal antibodies and protocols for producing such antibodies, *see, e.g.*, U.S. Patent 5,625,126; U.S. Patent 5,633,425; U.S. Patent 5,569,825; U.S. Patent 5,661,016; and U.S. Patent 5,545,806; each of which is incorporated herein by reference in its entirety. In addition, companies such as Abgenix, Inc. (Freemont, CA) and Genpharm (San Jose, CA) can be engaged to provide human antibodies directed against a selected antigen using technology similar to that described above.

Completely human antibodies which recognize a selected epitope can be generated using a technique referred to as "guided selection." In this approach a selected non-human monoclonal antibody, *e.g.*, a mouse antibody, is used to guide the selection of a completely human antibody recognizing the same epitope. (Jespers et al. (1994) Bio/technology 12:899-903).

In other embodiments, the invention provides fusion proteins of the antibodies of the invention (or functionally active fragments thereof), for example in which the antibody is fused via a covalent bond (*e.g.*, a peptide bond), at either the N-terminus or the C-terminus to an amino acid sequence of another protein (or portion thereof, preferably at least 10, 20 or 50 amino acid portion of the protein) that is not the antibody. Preferably, the antibody or fragment thereof is covalently linked to the other protein at the N-terminus of the constant domain.

The antibodies of the invention include analogs and derivatives that are either modified, *i.e*, by the covalent attachment of any type of molecule as long as such covalent attachment does not prevent the antibody from generating an anti-idiotypic response. For example, but not by way of limitation, the derivatives and analogs of the antibodies include those that have been further modified, *e.g.*, by glycosylation, acetylation, pegylation, phosphylation, amidation, derivatization by known protecting/blocking groups, proteolytic cleavage, linkage to a cellular ligand or other protein, etc. Any of numerous chemical modifications may be carried out by known techniques, including, but not limited to specific chemical cleavage, acetylation, formylation, metabolic synthesis of tunicamycin, etc. Additionally, the analog or derivative may contain one or more non-classical amino acids.

The antibodies of the invention include antibodies with modifications (*e.g.*, substitutions, deletions or additions) in amino acid residues that interact with Fc receptors. In particular, the antibodies of the invention include antibodies with modifications in amino acid residues identified as involved in the interaction between the Fc domain and the FcRn receptor (see, *e.g.*, PCT Publication No. WO 97/34631, which is incorporated herein by reference in its entirety).

### 5.3.1. ANTI-C3b(i) ANTIBODIES

In a specific embodiment, anti-C3b(i) antibodies are immunospecific for C3b(i) or a fragment thereof (*e.g.*, at least 5, at least 10, at least 15, at least 25, or more contiguous amino acid residues of C3b(i)). In another embodiment, anti-C3b(i) antibodies are immunospecific for C3b(i) covalently linked to a second molecule. In a preferred embodiment, anti-C3b(i) antibodies are monoclonal antibodies or Fab fragments. In another preferred embodiment, anti-C3b(i) antibodies are immunospecific for C3b(i) bound to IgG or IgM antibodies and said anti-C3b(i) antibodies have minimal cross-reactivity with C3b(i) in the media or milieu. In another preferred embodiment, anti-C3b(i) antibodies are immunospecific for C3b(i) bound to a cancer cell or C3b(i) bound to a virus or microbe; and said anti-C3b(i) antibodies have minimal cross-reactivity with C3b(i) in the media or milieu. In yet another preferred embodiment, anti-C3b(i) antibodies administered to humans are humanized or human monoclonal antibodies.

Anti-C3b(i) antibodies can be obtained from any organization (*e.g.*, a university scientist or a company such as Research Diagnostics Inc. in New Jersey) or produced by any method known to one of skill in the art. For example, anti-C3b(i) antibodies can be produced by chemical synthesis or recombinant expression techniques. The nucleotide sequence encoding an anti-C3b(i) antibodies can be obtained, *e.g.*, from the GenBank database or a database like it, the literature publications, or by routine cloning and sequencing.

In one embodiment, an anti-C3b(i) antibody is monoclonal antibody 7C12, 2H11, 8E11 or 3E7 (see, *e.g.*, Ferguson et al., 1995, Arthritis Rheum. 38:190; Taylor et al., 1989, J. Immunology 143:3626; Tosic et al., 1989, J. Immunol. Methods 120:241; and Sokoloff et al., 2000, Cancer Immunol. Immunother. 49:551-562, each of which is incorporated herein by reference in their entirety). In another embodiment, an anti-C3b(i) antibody is an antibody that competes with 7C12, 2H11, 8E11 or 3E7 for binding to C3b(i) or a fragment thereof, as determined by an immunoassay such as, *e.g.*, an ELISA. In a preferred embodiment, an anti-C3b(i) antibody is monoclonal antibody 3E7. In another preferred

embodiment, an anti-C3b(i) antibody is an antibody that competes with monoclonal 3E7 for binding to C3b(i) or a fragment thereof, as determined by an immunoassay such as, *e.g.*, an ELISA. In yet another preferred embodiment, an anti-C3b(i) antibody is a bispecific monoclonal antibody comprising monoclonal antibody 3E7 and monoclonal antibody 7G9 (see, *e.g.*, Sokoloff et al., 2000, Cancer Immunol. Immunother. 49:551-562).

### 5.3.2. ANTIBODIES IMMUNOSPECIFIC FOR CANCER CELLS

In a specific embodiment, antibodies immunospecific for a cancer cell antigen for use in accordance with methods of the invention are monoclonal antibodies or Fab fragments. Preferably, antibodies immunospecific for a cancer cell antigen which are administered to humans are humanized or human monoclonal antibodies. As used herein, the term "cancer cell antigen" refers to an antigen (*e.g.*, a protein, glycoprotein, polypeptide, peptide, or glycolipid) that is preferentially or differentially expressed on cancer cells relative to non-cancerous cells, preferably normal cells. Examples of cancer cell antigens include, but are not limited, to improperly glycosylated proteins and lipids, CD20, Her-2, and PSMA.

Antibodies immunospecific for a cancer cell antigen can be obtained from any organization (*e.g.*, a university scientist or a company such as Genentech) or produced by any method known to one of skill in the art such as, *e.g.*, chemical synthesis or recombinant expression techniques. The nucleotide sequence encoding antibodies immunospecific for a cancer cell antigen can be obtained, *e.g.*, from the GenBank database or a database like it, the literature publications, or by routine cloning and sequencing.

In a specific embodiment, known antibodies for the treatment or prevention cancer are used in accordance with the methods of the invention. Examples of antibodies available for the treatment of cancer include, but are not limited to, Herceptin® (Trastuzumab; Genetech, CA) which is a humanized anti-HER2 monoclonal antibody for the treatment of patients with metastatic breast cancer; Retuxan® (rituximab; Genentech) which is a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody for the treatment of patients with non-Hodgkin's lymphoma; OvaRex (AltaRex Corporation, MA) which is a murine antibody for the treatment of ovarian cancer; Panorex (Glaxo Wellcome, NC) which is a murine $IgG_{2a}$ antibody for the treatment of colorectal cancer; BEC2 (ImClone Systems Inc., NY) which is murine IgG antibody for the treatment of lung cancer; IMC-C225 (Imclone Systems Inc., NY) which is a chimeric IgG antibody for the treatment of head and neck cancer; Vitaxin (MedImmune, Inc., MD) which is a humanized antibody for the treatment of sarcoma; Campath I/H (Leukosite, MA) which is a humanized $IgG_1$ antibody for the treatment of

chronic lymphocytic leukemia (CLL); Smart MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA) which is a humanized IgG antibody for the treatment of acute myeloid leukemia (AML); LymphoCide (Immunomedics, Inc., NJ) which is a humanized IgG antibody for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma; Smart I D10 (Protein Design Labs, Inc., CA) which is a humanized antibody for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma; and Oncolym (Techniclone, Inc., CA) which is a murine antibody for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma.

### 5.3.3. ANTIBODIES TO VIRAL AND MICROBIAL ANTIGENS

In a specific embodiment, antibodies immunospecific for a viral or microbial antigen for use in accordance with methods of the invention are monoclonal antibodies. Preferably, antibodies immunospecific for a viral antigen or microbial antigen which are administered to humans are humanized or human monoclonal antibodies. As used herein, the term "viral antigen" includes, but is not limited to, any viral peptide, polypeptide protein (*e.g.*, HIV gp120, HIV nef, RSV F glycoprotein, influenza virus neuraminidase, influenza virus hemagglutinin, HTLV tax, herpes simplex virus glycoprotein (*e.g.*, gB, gC, gD, and gE) and hepatitis B surface antigen) which is capable of eliciting an immune response. As used herein, the term "microbial antigen" includes, but is not limited to, any microbial peptide, polypeptide, protein, saccharide, polysaccharide, or lipid molecule (*e.g.*, a bacterial, fungi, pathogenic protozoa, or yeast polypeptide including, *e.g.*, LPS and capsular polysaccharide 5/8) which is capable of eliciting an immune response.

Antibodies immunospecific for a viral or microbial antigen can be obtained from any organization (*e.g.*, a university scientist or a company such as Genentech) or produced by any method known to one of skill in the art such as, *e.g.*, chemical synthesis or recombinant expression techniques. The nucleotide sequence encoding antibodies immunospecific for a viral or microbial antigen can be obtained, *e.g.*, from the GenBank database or a database like it, the literature publications, or by routine cloning and sequencing.

In a specific embodiment, known antibodies for the treatment or prevention viral or microbial infection are used in accordance with the methods of the invention. Examples of antibodies available for the treatment of viral infection or microbial infection include, but are not limited to, Synagis® (MedImmune, Inc., MD) which is a humanized anti-respiratory syncytial virus (RSV) monoclonal antibody for the treatment of patients with RSV infection; PRO542 (Progenics) which is a CD4 fusion antibody for the treatment of HIV infection; Ostavir (Protein Design Labs, Inc., CA) which is a human antibody for the treatment of hepatitis B virus; Protovir (Protein Design Labs, Inc., CA) which is a

humanized $IgG_1$ antibody for the treatment of cytomegalovirus (CMV); and anti-LPS antibodies.

### 5.4. PRODUCTION OF RECOMBINANT ANTIBODIES

The antibodies of the invention can be produced by any method known in the art for the synthesis of antibodies, in particular, by chemical synthesis or by recombinant expression, and are preferably produced by recombinant expression techniques.

Recombinant expression of the antibodies of the invention, or fragment, derivative or analog thereof, requires construction of a nucleic acid that encodes the antibody. If the nucleotide sequence of the antibody is known, a nucleic acid encoding the antibody may be assembled from chemically synthesized oligonucleotides (*e.g.*, as described in Kutmeier et al., 1994, BioTechniques 17:242), which, briefly, involves the synthesis of overlapping oligonucleotides containing portions of the sequence encoding the antibody, annealing and ligation of those oligonucleotides, and then amplification of the ligated oligonucleotides by PCR.

Alternatively, a nucleic acid molecule encoding an antibody may be generated from a suitable source. If a clone containing the nucleic acid encoding the particular antibody is not available, but the sequence of the antibody is known, a nucleic acid encoding the antibody may be obtained from a suitable source (*e.g.*, an antibody cDNA library, or cDNA library generated from any tissue or cells expressing the immunoglobulin) by PCR amplification using synthetic primers hybridizable to the 3' and 5' ends of the sequence or by cloning using an oligonucleotide probe specific for the particular gene sequence.

If an antibody that specifically recognizes a particular antigen is not available (or a source for a cDNA library for cloning a nucleic acid encoding such an immunoglobulin), antibodies specific for a particular antigen may be generated by any method known in the art, for example, by immunizing an animal, such as a rabbit, to generate polyclonal antibodies or, more preferably, by generating monoclonal antibodies, *e.g.*, as described by Kohler and Milstein (1975, *Nature* 256:495-497) or, as described by Kozbor et al. (1983, *Immunology Today* 4:72) or Cole et al. (1985 in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Alternatively, a clone encoding at least the Fab portion of the antibody may be obtained by screening Fab expression libraries (*e.g.*, as described in Huse et al., 1989, *Science* 246:1275-1281) for clones of Fab fragments that bind the specific antigen or by screening antibody libraries (See, *e.g.*, Clackson et al., 1991, Nature 352:624; Hane et al., 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937).

Once a nucleic acid sequence encoding at least the variable domain of the antibody is obtained, it may be introduced into a vector containing the nucleotide sequence encoding the constant regions of the antibody (see, *e.g.*, PCT Publication No.WO 86/05807; PCT Publication No. WO 89/01036; and U.S. Patent No. 5,122,464). Vectors containing the complete light or heavy chain that allow for the expression of a complete antibody molecule are available. Then, the nucleic acid encoding the antibody can be used to introduce the nucleotide substitutions or deletion necessary to substitute (or delete) the one or more variable region cysteine residues participating in an intrachain disulfide bond with an amino acid residue that does not contain a sulfhydyl group. Such modifications can be carried out by any method known in the art for the introduction of specific mutations or deletions in a nucleotide sequence, for example, but not limited to, chemical mutagenesis and *in vitro* site directed mutagenesis (Hutchinson et al., 1978, J. Biol. Chem. 253:6551).

In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies" (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger et al., 1984, *Nature* 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454) by splicing genes from a mouse antibody molecule of appropriate antigen specificity together with genes from a human antibody molecule of appropriate biological activity can be used. As described *supra*, a chimeric antibody is a molecule in which different portions are derived from different animal species, such as those having a variable region derived from a murine monoclonal antibody and a human immunoglobulin constant region, *e.g.*, humanized antibodies.

Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. Patent 4,694,778; Bird, 1988, Science 242:423-42; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; and Ward et al., 1989, Nature 334:544-54) can be adapted to produce single chain antibodies. Single chain antibodies are formed by linking the heavy and light chain fragments of the Fv region via an amino acid bridge, resulting in a single chain polypeptide. Techniques for the assembly of functional Fv fragments in *E. coli* may also be used (Skerra et al., 1988, Science 242:1038-1041).

Antibody fragments which recognize specific epitopes may be generated by known techniques. For example, such fragments include but are not limited to: the $F(ab')_2$ fragments which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and the Fab fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the $F(ab')_2$ fragments.

Once a nucleic acid sequence encoding an antibody of the invention has been obtained, the vector for the production of the antibody may be produced by recombinant DNA technology using techniques well known in the art. Methods which are well known to

those skilled in the art can be used to construct expression vectors containing the antibody coding sequences and appropriate transcriptional and translational control signals. These methods include, for example, *in vitro* recombinant DNA techniques, synthetic techniques, and *in vivo* genetic recombination. See, for example, the techniques described in Sambrook et al. (1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) and Ausubel et al. (eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY).

An expression vector comprising the nucleotide sequence of an antibody or the nucleotide sequence of an antibody can be transferred to a host cell by conventional techniques (*e.g.*, electroporation, liposomal transfection, and calcium phosphate precipitation) and the transfected cells are then cultured by conventional techniques to produce the antibody of the invention. In specific embodiments, the expression of the antibody is regulated by a constitutive, an inducible or a tissue, specific promoter.

The host cells used to express the recombinant antibody of the invention may be either bacterial cells such as *Escherichia coli,* or, preferably, eukaryotic cells, especially for the expression of whole recombinant immunoglobulin molecule. In particular, mammalian cells such as Chinese hamster ovary cells (CHO), in conjunction with a vector such as the major intermediate early gene promoter element from human cytomegalovirus is an effective expression system for immunoglobulins (Foecking et al., 198, Gene 45:101; Cockett et al., 1990, Bio/Technology 8:2).

A variety of host-expression vector systems may be utilized to express the immunoglobulin molecules of the invention. Such host-expression systems represent vehicles by which the coding sequences of the antibody may be produced and subsequently purified, but also represent cells which may, when transformed or transfected with the appropriate nucleotide coding sequences, express the immunoglobulin molecule of the invention *in situ.* These include, but are not limited to, microorganisms such as bacteria (*e.g.*, *E. coli* and *B. subtilis*) transformed with recombinant bacteriophage DNA, plasmid DNA or cosmid DNA expression vectors containing immunoglobulin coding sequences; yeast (*e.g.*, *Saccharomyces Pichia*) transformed with recombinant yeast expression vectors containing immunoglobulin coding sequences; insect cell systems infected with recombinant virus expression vectors (*e.g.*, baculovirus) containing the immunoglobulin coding sequences; plant cell systems infected with recombinant virus expression vectors (*e.g.*, cauliflower mosaic virus (CaMV) and tobacco mosaic virus (TMV)) or transformed with recombinant plasmid expres-sion vectors (*e.g.*, Ti plasmid) containing immunoglobulin coding sequences; or mammalian cell systems (*e.g.*, COS, CHO, BHK,

293, 293T, 3T3 cells) harboring recombinant expression constructs containing promoters derived from the genome of mammalian cells (*e.g.*, metallothionein promoter) or from mammalian viruses (*e.g.*, the adenovirus late promoter; the vaccinia virus 7.5K promoter).

In bacterial systems, a number of expression vectors may be advantageously selected depending upon the use intended for the antibody being expressed. For example, when a large quantity of such a protein is to be produced, for the generation of pharmaceutical compositions of an antibody, vectors which direct the expression of high levels of fusion protein products that are readily purified may be desirable. Such vectors include, but are not limited, to the *E. coli* expression vector pUR278 (Ruther et al., 1983, EMBO J. 2:1791), in which the antibody coding sequence may be ligated individually into the vector in frame with the *lac Z* coding region so that a fusion protein is produced; pIN vectors (Inouye & Inouye, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509); and the like. pGEX vectors may also be used to express foreign polypeptides as fusion proteins with glutathione S-transferase (GST). In general, such fusion proteins are soluble and can easily be purified from lysed cells by adsorption and binding to a matrix glutathione-agarose beads followed by elution in the presence of free gluta-thione. The pGEX vectors are designed to include thrombin or factor Xa protease cleavage sites so that the cloned target gene product can be released from the GST moiety.

In an insect system, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) is used as a vector to express foreign genes. The virus grows in *Spodoptera frugiperda* cells. The antibody coding sequence may be cloned individually into non-essential regions (for example the polyhedrin gene) of the virus and placed under control of an AcNPV promoter (for example the polyhedrin promoter).

In mammalian host cells, a number of viral-based expression systems may be utilized. In cases where an adenovirus is used as an expression vector, the antibody coding sequence of interest may be ligated to an adenovirus transcription/translation control complex, *e.g.*, the late promoter and tripartite leader sequence. This chimeric gene may then be inserted in the adenovirus genome by *in vitro* or *in vivo* recombination. Insertion in a non-essential region of the viral genome (*e.g.*, region E1 or E3) will result in a recombinant virus that is viable and capable of expressing the immunoglobulin molecule in infected hosts. (*e.g.*, see Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359). Specific initiation signals may also be required for efficient translation of inserted antibody coding sequences. These signals include the ATG initiation codon and adjacent sequences. Furthermore, the initiation codon must be in phase with the reading frame of the desired coding sequence to ensure translation of the entire insert. These exogenous translational

control signals and initiation codons can be of a variety of origins, both natural and synthetic. The efficiency of expression may be enhanced by the inclusion of appropriate transcription enhancer elements, transcription terminators, etc. (see Bittner et al., 1987, *Methods in Enzymol.* 153:51-544).

In addition, a host cell strain may be chosen which modulates the expression of the inserted sequences, or modifies and processes the gene product in the specific fashion desired. Such modifications (*e.g.*, glycosylation) and processing (*e.g.*, cleavage) of protein products may be important for the function of the protein. Different host cells have characteristic and specific mechanisms for the post-translational processing and modification of proteins and gene products. Appropriate cell lines or host systems can be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein expressed. To this end, eukaryotic host cells which possess the cellular machinery for proper processing of the primary transcript, glycosylation, and phosphorylation of the gene product may be used. Such mammalian host cells include but are not limited to CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 and T47D, CRL7030 and Hs578Bst.

For long-term, high-yield production of recombinant proteins, stable expression is preferred. For example, cell lines which stably express an antibody may be engineered. Rather than using expression vectors which contain viral origins of replication, host cells can be transformed with DNA controlled by appropriate expression control elements (*e.g.*, promoter, enhancer, sequences, transcription terminators, polyadenylation sites, etc.), and a selectable marker. Following the introduction of the foreign DNA, engineered cells may be allowed to grow for 1-2 days in an enriched media, and then are switched to a selective media. The selectable marker in the recombinant plasmid confers resistance to the selection and allows cells to stably integrate the plasmid into their chromosomes and grow to form foci which in turn can be cloned and expanded into cell lines. This method may advantageously be used to engineer cell lines which express the antibody Such engineered cell lines may be particularly useful in screening and evaluation of compounds that interact directly or indirectly with the antibody.

A number of selection systems may be used, including but not limited to the herpes simplex virus thymidine kinase (Wigler et al., 1977, Cell 11:223), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (Szybalska & Szybalski, 192, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202), and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy et al., 1980, Cell 22:817) genes can be employed in tk-, hgprt- or aprt- cells, respectively. Also, antimetabolite resistance can be used as the basis of selection for the following genes: dhfr, which confers resistance to

methotrexate (Wigler et al., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:357; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); gpt, which confers resistance to mycophenolic acid (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); neo, which confers resistance to the aminoglycoside G-418Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; and Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIB TECH 11(5):155-215). Methods commonly known in the art of recombinant DNA technology which can be used are described in Ausubel et al. (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; and in Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1; and hygro, which confers resistance to hygromycin (Santerre et al., 1984, Gene 30:147).

The expression levels of an antibody can be increased by vector amplification (for a review, see Bebbington and Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987)). When a marker in the vector system expressing an antibody is amplifiable, increase in the level of inhibitor present in culture of host cell will increase the number of copies of the marker gene. Since the amplified region is associated with the nucleotide sequence of the antibody, production of the antibody will also increase (Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257).

The host cell may be co-transfected with two expression vectors of the invention, the first vector encoding a heavy chain derived polypeptide and the second vector encoding a light chain derived polypeptide. The two vectors may contain identical selectable markers which enable equal expression of heavy and light chain polypeptides. Alternatively, a single vector may be used which encodes both heavy and light chain polypeptides. In such situations, the light chain should be placed before the heavy chain to avoid an excess of toxic free heavy chain (Proudfoot, 1986, Nature 322:52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197). The coding sequences for the heavy and light chains may comprise cDNA or genomic DNA.

Once the antibody has been recombinantly expressed, it may be purified by any method known in the art for purification of an antibody, for example, by chromatography (*e.g.*, ion exchange, affinity, particularly by affinity for the specific antigen after Protein A, and sizing column chromatography), centrifugation, differential solubility, or by any other standard technique for the purification of proteins.

### 5.5. ANTIBODY CONJUGATES

In certain embodiments, one or more antibodies immunospecific for one or more cancer cell antigens, viral antigens or microbial antigens are conjugated to a therapeutic agent. In a preferred embodiment, anti-C3b(i) antibodies are conjugated to a diagnostic or therapeutic agent. The antibodies can be used diagnostically to, for example, monitor the development or progression of a tumor as part of a clinical testing procedure to, *e.g.*, determine the efficacy of a given treatment regimen. Detection can be facilitated by coupling the antibody to a detectable substance. Examples of detectable substances include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials, bioluminescent materials, radioactive materials, positron emitting metals using various positron emission tomographies, and nonradioactive paramagnetic metal ions. See generally U.S. Patent No. 4,741,900 for metal ions which can be conjugated to antibodies for use as diagnostics according to the present invention. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, beta-galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an example of a luminescent material includes luminol; examples of bioluminescent materials include luciferase, luciferin, and aequorin, and examples of suitable radioactive material include $^{125}I$, $^{131}I$, $^{111}In$ or $^{99}Tc$.

Further, an antibody may be conjugated to a therapeutic moiety such as a cytotoxin, *e.g.*, a cytostatic or cytocidal agent, a therapeutic agent or a radioactive metal ion. A cytotoxin or cytotoxic agent includes any agent that is detrimental to cells. Examples include paclitaxol, cytochalasin B, gramicidin D, ethidium bromide, emetine, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracin dione, mitoxantrone, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosterone, glucocorticoids, procaine, tetracaine, lidocaine, propranolol, and puromycin and analogs or homologs thereof. Therapeutic agents include, but are not limited to, antimetabolites (*e.g.*, methotrexate, 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, cytarabine, 5-fluorouracil decarbazine), alkylating agents (*e.g.*, mechlorethamine, thioepa chlorambucil, melphalan, carmustine (BSNU) and lomustine (CCNU), cyclothosphamide, busulfan, dibromomannitol, streptozotocin, mitomycin C, and cis-dichlorodiamine platinum (II) (DDP) cisplatin), anthracyclines (*e.g.*, daunorubicin (formerly daunomycin) and doxorubicin), antibiotics (*e.g.*, dactinomycin (formerly actinomycin), bleomycin,

mithramycin, anthramycin (AMC)), and anti-mitotic agents (*e.g.*, vincristine and vinblastine).

In one embodiment, anti-C3b(i) antibodies are conjugated to cobra venom factor. In accordance with the invention, C3b(i) specific antibodies conjugated to cobra venom factor are utilized *in vitro* to deplete cancerous cells from, *e.g.*, bone marrow obtained from an animal, preferably a mammal and most preferably a human, with cancer. Methods of conjugating antibodies to cobra venom factor are taught in U.S. Patent No. 5,773,243, which is incorporated herein by reference in its entirety.

The conjugates of the invention can be used for modifying a given biological response; thus, the therapeutic agent or drug moiety is not to be construed as limited to classical chemical therapeutic agents. For example, the drug moiety may be a protein or polypeptide possessing a desired biological activity. Such proteins may include, for example, a toxin such as abrin, ricin A, pseudomonas exotoxin, or diphtheria toxin; a protein such as tumor necrosis factor, α-interferon, β-interferon,γ-interferon, nerve growth factor, platelet derived growth factor, tissue plasminogen activator, a thrombotic agent or an anti-angiogenic agent, *e.g.*, angiostatin or endostatin; or, biological response modifiers such as, for example, lymphokines, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5 ,IL-6, IL-7, Il-8, Il-9, Il-10, IL-12, IL-15, granulocyte macrophase colony stimulating factor ("GM-CSF"), granulocyte colony stimulating factor ("G-CSF"), or other growth factors.

Techniques for conjugating therapeutic moieties to antibodies are well known, see, *e.g.*, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982); each of which is incorporated herein by reference.

Alternatively, an antibody can be conjugated to a second antibody to form an antibody heteroconjugate as described by Segal in U.S. Patent No. 4,676,980, which is incorporated herein by reference.

An antibody with or without a therapeutic moiety conjugated to it can be used as a therapeutic and administered alone or in combination with cytotoxic factor(s) and/or cytokine(s).

## 5.6. DEPLETION OF CANCEROUS CELLS *IN VITRO*

The invention provides for methods of depleting cancerous cells from non-cancerous tissues and/or cells *in vitro* (or *ex vivo*). In particular, the invention provides for methods of depleting cancerous cells by killing them or by separating them from non-cancerous cells. In one embodiment, anti-C3b(i) antibodies alone or in combination with plasma, are combined *in vitro* with tissues and/or cells obtained from an animal, preferably a mammal and most preferably a human. In another embodiment, anti-C3b(i) antibodies alone or in combination with IgG antibodies, IgM antibodies and/or one or more complement components, are combined *in vitro* with tissues and/or cells obtained from an animal, preferably a mammal and most preferably a human. In another embodiment, anti-C3b(i) antibodies alone or in combination with antibodies immunospecific for cancer cell antigens are combined *in vitro* with tissues and/or cells obtained from an animal, preferably a mammal and most preferably a human. Preferably, the tissue obtained from an animal for the *in vitro* depletion of cancerous cells from non-cancerous cells is bone marrow and /or peripheral blood.

In a specific embodiment, monoclonal antibodies immunospecific for C3b(i) are incubated *in vitro* with tissues and/or cells obtained from an animal, preferably a mammal and most preferably a human. In a preferred embodiment, the monoclonal antibodies are immunospecific for C3b(i) covalently linked to IgM or IgG antibody which is bound to the cancer cells. In another preferred embodiment, the monoclonal antibodies are immunospecific for C3b(i) covalently linked to a glycoprotein or or glycolípid on the cancer cells, CD20, Her2 or PSMA.

In a preferred embodiment, bispecific antibodies which are immunospecific for C3b(i) and an effector cell receptor or antigen are incubated *in vitro* with tissues and/or cells obtained from an animal, preferably a mammal and most preferably a human. In another preferred embodiment, bispecific antibodies which are immunospecific for C3b(i) and a complement component (*e.g.*, C1q) are incubated *in vitro* with tissues and/or cells obtained from an animal, preferably a mammal and most preferably a human. In a particular embodiment, bispecific diabodies which are antibodies fragments immunospecific for C3b(i) and a complement component (*e.g.*, C1q) are incubated *in vitro* with tissues and/or cells obtained from an animal, preferably a mammal and most preferably a human. In

accordance with this embodiment, the bispecific diabodies facilitate complement mediated lysis of the cancer cells.

In accordance with the invention, the anti-C3b(i) antibodies used in the *in vitro* depletion of cancer cells from tissues can be conjugated to detectable substances (*e.g.*, various enzymes, fluorescent materials, luminescent materials, bioluminescent materials, and radioactive materials) or therapeutic agents (*e.g.*, cytostatic and cytocidal agents), which are disclosed in section 5.5. For example, anti-C3b(i) antibodies may be conjugated to cobra venom factor in order to use enhanced complement activation to lyse the cancer cells. In a specific embodiment, tissues and/or cells thus depleted of cancerous cells are administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human. In a preferred embodiment, the tissues and/or cells are obtained from an animal with cancer prior to treatment for cancer, and tissues and/or cells depleted of cancerous cells are administered to the animal after the treatment. In yet another preferred embodiment, the *in vitro* depletion of cancerous cells using anti-C3b(i) antibodies is done prior to administration of autologous bone marrow peripheral blood, or peripheral blood stem cells.

Anti-C3b(i) antibodies conjugated to detectable substances can be utilized to sort cancerous cells from non-cancerous cells by methods known to those of skill in the art. In one embodiment, cancerous cells are sorted using a fluorescence activated cell sorter (FACS). Fluorescence activated cell sorting (FACS) is a well-known method for separating particles, including cells, based on the fluorescent properties of the particles (Kamarch, 1987, Methods Enzymol, 151:150-165). Laser excitation of fluorescent moieties in the individual particles results in a small electrical charge allowing electromagnetic separation of positive and negative particles from a mixture.

In one embodiment, cells, particularly bone marrow cells or peripheral blood stem cells, obtained from an animal, preferably a mammal and most preferably a human, are incubated with fluorescently labeled C3b(i) specific antibodies for a time sufficient to allow the labeled antibodies to bind to the cells (*e.g.*, 10 minutes, 20 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 60 minutes, 90 minutes, 120 minutes or more), preferably between 10 to 60 minutes. In an alternative embodiment, cells, particularly bone marrow cells or peripheral blood stem cells, obtained from an animal preferably a mammal and most preferably a human, are incubated with C3b(i) specific antibodies, the cells are washed, and the cells are incubated with a second labeled antibody that recognizes the C3b(i) specific antibodies. In accordance with these embodiments, the cells are washed and processed through the cell sorter, allowing separation of cells that bind both antibodies to be separated from hybrid

cells that do not bind both antibodies. FACS sorted particles may be directly deposited into individual wells of 96-well or 384-well plates to facilitate separation.

In another embodiment, magnetic beads can be used to separate cancerous cells from non-cancerous cells. Cancerous cells may be sorted using a magnetic activated cell sorting (MACS) technique, a method for separating particles based on their ability to bind magnetic beads (0.5-100 nm diameter) (Dynal, 1995). A variety of useful modifications can be performed on the magnetic microspheres, including covalent addition of antibody which immunospecifically recognizes C3b(i). A magnetic field is then applied, to physically manipulate the selected beads. The beads are then mixed with the cells to allow binding. Cells are then passed through a magnetic field to separate out cancerous cells.

### 5.7. THERAPEUTIC AND PROPHYLACTIC USE OF ANTI-C3b(i) ANTIBODIES

The invention provides for treatment or prevention of cancer, including, but not limited to, neoplasms, tumors, metastases, or any disease or disorder characterized by uncontrolled cell growth, by the administration of therapeutically or prophylactically effective amounts of anti-C3b(i) antibodies or nucleic acid molecules encoding said antibodies. Examples of types of cancer and proliferative disorders include, but are not limited to, leukemia (*e.g.*, myeloblastic, promyelocytic, myelomonocytic, monocytic, erythroleukemia, chronic myelocytic (granulocytic) leukemia, and chronic lymphocytic leukemia), lymphoma (*e.g.*, Hodgkin's disease and non-Hodgkin's disease), fibrosarcoma, myxosarcoma, liposarcoma, chondrosarcoma, osteogenic sarcoma, angiosarcoma, endotheliosarcoma, Ewing's tumor, colon carcinoma, pancreatic cancer, breast cancer, ovarian cancer, prostate cancer, squamous cell carcinoma, basal cell carcinoma, adenocarcinoma, renal cell carcinoma, hepatoma, Wilms' tumor, cervical cancer, uterine cancer, testicular tumor, lung carcinoma, small cell lung carcinoma, bladder carcinoma, epithelial carcinoma, glioma, astrocytoma, oligodendroglioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, dysplasia and hyperplasia. In a particular embodiment, therapeutic compounds of the invention are administered to men with prostate cancer (*e.g.*, prostatitis, benign prostatic hypertrophy, benign prostatic hyperplasia (BPH), prostatic paraganglioma, prostate adenocarcinoma, prostatic intraepithelial neoplasia, prostato-rectal fistulas, and atypical prostatic stromal lesions). The treatment and/or prevention of cancer includes, but is not limited to, alleviating one or more symptoms associated with cancer, the inhibition or reduction of the progression of cancer, the promotion of the regression of cancer, and/or the promotion of the immune response. In one embodiment, commercially available or

naturally occurring anti-C3b(i) antibodies, functionally active fragments or derivatives thereof are used in the present invention.

In certain embodiments, a composition of the invention is administered to an animal to ameliorate one or more symptoms associated with cancer. In certain other embodiments, a composition of the invention is administered to an animal to inhibit or reduce the progression of cancer. In certain other embodiments, a composition of the invention is administered to an animal to promote the regression of cancer.

In a specific embodiment, a composition comprising a therapeutically effective amount of one or more anti-C3b(i) antibodies is administered to an animal in order to ameliorate one or more symptoms associated with cancer. In another embodiment, a composition comprising a therapeutically effective amount of one or more anti-C3b(i) antibodies is administered to an animal in order to promote of the regression of cancer and/or the inhibit or reduce the progression of cancer in an animal. In another embodiment, a composition comprising a therapeutically effective amount of one or more anti-C3b(i) antibodies and one or more antibodies immunospecific for one or more cancer cell antigens is administered to an animal in order to ameliorate one or more symptoms associated with cancer. In yet another embodiment, a composition comprising a therapeutically effective amount of one or more anti-C3b(i) antibodies and one or more antibodies immunospecific for one or more cancer cell antigens is administered to an animal in order to promote of the regression of cancer and/or the inhibit or reduce the progression of cancer in an animal.

Anti-C3b(i) antibodies may be administered alone or in combination with other types of cancer treatments (*e.g.*, radiation therapy, chemotherapy, hormonal therapy, immunotherapy and anti-tumor agents). Examples of anti-tumor agents include, but are not limited to, cisplatin, ifosfamide, paclitaxel, taxanes, topoisomerase I inhibitors (*e.g.*, CPT-11, topotecan, 9-AC, and GG-211), gemcitabine, vinorelbine, oxaliplatin, 5-fluorouracil (5-FU), leucovorin, vinorelbine, temodal, and taxol. In one embodiment, one or more anti-C3b(i) antibodies are administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, after surgical resection of cancer. In another embodiment, one or more anti-C3b(i) antibodies are administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, in conjugation with chemotherapy or radiotherapy. In another embodiment, one or more anti-C3b(i) antibodies are administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, for the prevention or treatment of cancer prior to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week before), subsequent to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24

hours, 2 days, or 1 week after), or concomitantly with the administration of plasma to the animal.

In a preferred embodiment, one or more anti-C3b(i) antibodies are administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, for the prevention or treatment of cancer prior to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week before), subsequent to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week after), or concomitantly with the administration of IgG antibodies, IgM antibodies and/or one or more complement components to the animal. In another preferred embodiment, one or more anti-C3b(i) antibodies are administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, prior to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week before), subsequent to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week after), or concomitantly with the administration of antibodies immunospecific for one or more cancer cell antigens. In yet another preferred embodiment, one or more anti-C3b(i) antibodies are administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, for the prevention or treatment of cancer prior to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week before), subsequent to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week after), or concomitantly with the administration of antibodies currently used for the treatment of cancer. Examples of such antibodies include, but are not limited to, Herceptin® , Retuxan®, OvaRex, Panorex, BEC2, IMC-C225, Vitaxin, Campath I/H, Smart MI95, LymphoCide, Smart I D10, and Oncolym.

In a specific embodiment, men with prostate cancer are administered anti-C3b(i) antibodies in conjugation with androgen ablation therapy. In another specific embodiment, non-Hodgkin's lymphoma patients are treated with Retuxan® prior to the administration of anti-C3b(i) antibodies. In certain embodiments, animals with increased risk of cancer are administered a composition of the invention. Examples of such animals include, but are not limited to, humans prone to breast cancer.

The invention provides methods for the treatment or prevention of viral infections in an animal, preferably a mammal and most preferably a human, said methods comprising the administration of a therapeutically or prophylactically effective amount of anti-C3b(i) antibodies or nucleic acid molecules encoding said antibodies. Examples of viral infections

which can be treated or prevented in accordance with this invention include, but are limited to, viral infections caused by retroviruses (*e.g.*, human T-cell lymphotrophic virus (HTLV) types I and II and human immunodeficiency virus (HIV)), herpes viruses (*e.g.*, herpes simplex virus (HSV) types I and II, Epstein-Barr virus and cytomegalovirus), arenaviruses (*e.g.*, lassa fever virus), paramyxoviruses (*e.g.*, morbillivirus virus, human respiratory syncytial virus, and pneumovirus), adenoviruses, bunyaviruses (*e.g.*, hantavirus), cornaviruses, filoviruses (*e.g.*, Ebola virus), flaviviruses ( *e.g.*, hepatitis C virus (HCV), yellow fever virus, and Japanese encephalitis virus), hepadnaviruses (*e.g.*, hepatitis B viruses (HBV)), orthomyoviruses (*e.g.*, Sendai virus and influenza viruses A, B and C), papovaviruses (*e.g.*, papillomavirues), picornaviruses (*e.g.*, rhinoviruses, enteroviruses and hepatitis A viruses), poxviruses, reoviruses (*e.g.*, rotavirues), togaviruses (*e.g.*, rubella virus), and rhabdoviruses (*e.g.*, rabies virus). The treatment and/or prevention of a viral infection includes, but is not limited to, alleviating one or more symptoms associated with said infection, the inhibition, reduction or suppression of viral replication, and/or the enhancement of the immune response.

In certain embodiments, a composition of the invention is administered to an animal to ameliorate one or more symptoms associated with a viral infection or a disease or disorder resulting, directly or indirectly, from a viral infection. In a specific embodiment, a composition of the invention is administered to a human to ameliorate one or more symptoms associated with AIDS. In certain other embodiments, a composition of the invention is administered to reduce the titer of a virus in an animal. In certain other embodiments, a composition of the invention is administered to an animal to enhance or promote the immune response.

In a specific embodiment, a composition comprising a therapeutically effective amount of one or more anti-C3b(i) antibodies is administered to an animal in order to ameliorate one or more symptoms associated with a viral infection. In another embodiment, a composition comprising a therapeutically effective amount of one or more anti-C3b(i) antibodies is administered to an animal in order to reduce the titer of a virus in an animal. In another embodiment, a composition comprising a therapeutically effective amount of one or more anti-C3b(i) antibodies and one or more antibodies immunospecific for one or more viral antigens is administered to an animal in order to ameliorate one or more symptoms associated with a viral infection. In yet another embodiment, a composition comprising a therapeutically effective amount of one or more anti-C3b(i) antibodies and one or more antibodies immunospecific for one or more viral antigens is administered to an animal in order to reduce the titer of a virus in an animal.

Anti-C3b(i) antibodies may be administered alone or in combination with other types of anti-viral agents. Examples of anti-viral agents include, but are not limited to: cytokines (*e.g.*, IFN-α, IFN-β, and IFN-γ); inhibitors of reverse transcriptase (*e.g.*, AZT, 3TC, D4T, ddC, ddI, d4T, 3TC, adefovir, efavirenz, delavirdine, nevirapine, abacavir, and other dideoxynucleosides or dideoxyfluoronucleosides); inhibitors of viral mRNA capping, such as ribavirin; inhibitors of proteases such HIV protease inhibitors (*e.g.*, amprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir, and saquinavir,); amphotericin B; castanospermine as an inhibitor of glycoprotein processing; inhibitors of neuraminidase such as influenza virus neuraminidase inhibitors (*e.g.*, zanamivir and oseltamivir); topoisomerase I inhibitors (*e.g.*, camptothecins and analogs thereof); amantadine; and rimantadine. Such anti-viral agents may be administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, for the prevention or treatment of a viral infection prior to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week before), subsequent to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week after), or concomitantly with the administration of anti-C3b(i) antibodies to the animal.

In a specific embodiment, one or more anti-C3b(i) antibodies are administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, for the prevention or treatment of a viral infection prior to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week before), subsequent to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week after), or concomitantly with the administration of plasma to the animal.

In a preferred embodiment, one or more anti-C3b(i) antibodies are administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, for the prevention or treatment of a viral infection prior to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week before), subsequent to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week after), or concomitantly with the administration of IgG antibodies, IgM antibodies and/or one or more complement components to the animal. In another preferred embodiment, anti-C3b(i) antibodies are administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, for the prevention or treatment of a viral infection prior to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week before), subsequent to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours,

4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week after), or concomitantly with the administration of antibodies immunospecific for one or more viral antigens. Example of antibodies immunospecific for viral antigens include, but are not limited to, Synagis®, PRO542, Ostavir, and Protovir.

The invention provides methods for the treatment or prevention of microbial infections in an animal, preferably a mammal and most preferably a human, said methods comprising the administration of a therapeutically or prophylactically effective amount of anti-C3b(i) antibodies or nucleic acid molecules encoding said antibodies. Examples of microbial infections which can be treated or prevented in accordance with this invention include, but are not limited to, yeast infections, fungal infections, protozoan infections and bacterial infections. Bacteria which cause microbial infections include, but are not limited to, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae* , *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromotis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter* (Vibrio) *fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Treponema carateneum*, *Borrelia vincentii*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira icterohemorrhagiae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis carinii*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *Mycoplasma spp.*, *Rickettsia prowazeki*, *Rickettsia tsutsugumushi*, *Chlamydia spp.*, and *Helicobacter pylori*. The treatment and/or prevention of a microbial infection includes, but is not limited to, alleviating one or more symptoms associated with said infection, the inhibition, reduction or suppression of microbial replication, and/or the enhancement of the immune response.

In certain embodiments, a composition of the invention is administered to an animal to ameliorate one or more symptoms associated with a microbial infection or a disease or disorder resulting, directly or indirectly, from a microbial infection. In certain other embodiments, a composition of the invention is administered to reduce the number or microbes in an animal.

In a specific embodiment, a composition comprising a therapeutically effective amount of one or more anti-C3b(i) antibodies is administered to an animal in order to ameliorate one or more symptoms associated with a microbial infection. In another

embodiment, a composition comprising a therapeutically effective amount of one or more anti-C3b(i) antibodies is administered to an animal in order to reduce the number of microbes in an animal. In another embodiment, a composition comprising a therapeutically effective amount of one or more anti-C3b(i) antibodies and one or more antibodies immunospecific for one or more microbial antigens is administered to an animal in order to ameliorate one or more symptoms associated with a microbial infection. In yet another embodiment, a composition comprising a therapeutically effective amount of one or more anti-C3b(i) antibodies and one or more antibodies immunospecific for one or more microbial antigens is administered to an animal in order to reduce the number of microbes in an animal.

Anti-C3b(i) antibodies may be administered alone or in combination with other types of anti-microbial agents. Examples of anti-microbial agents include, but are not limited to: antibiotics such as penicillin, amoxicillin, ampicillin, carbenicillin, ticarcillin, piperacillin, cepalospolin, vancomycin, tetracycline, erythromycin, amphotericin B, nystatin, metronidazole, ketoconazole, and pentamidine. Such anti-microbial agents may be administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, for the prevention or treatment of a microbial infection prior to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week before), subsequent to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week after), or concomitantly with the administration of anti-C3b(i) antibodies to the animal.

In a specific embodiment, anti-C3b(i) antibodies are administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, for the prevention or treatment of a microbial infection prior to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week before), subsequent to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week after) or concomitantly with the administration of plasma to the animal.

In a preferred embodiment, one or more anti-C3b(i) antibodies are administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, for the prevention or treatment of a microbial infection prior to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week before), subsequent to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week after), or concomitantly with the administration of IgG antibodies, IgM antibodies and/or one or more complement

components to the animal. In another preferred embodiment, one or more anti-C3b(i) antibodies are administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, for the prevention or treatment of a microbial infection prior to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week before), subsequent to (*e.g.*, 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, 2 days, or 1 week after), or concomitantly with the administration of antibodies immunospecific for one or more microbial antigens. Example of antibodies immunospecific for microbial antigens include, but are not limited to, antibodies immunospecific for LPS and capsular polysaccharide 5/8. In certain embodiments, animals with increased risk of a viral or bacterial infection are administered a composition of the invention. Examples of such animals include, but are not limited to human burn patients, infants, immunocompromised or immunodeficient humans, and the elderly.

The present invention provides methods for the treatment or prevention of septic shock caused by lipopolysaccharide (LPS), an endotoxin, or a constituent of the outer cell wall of a gram negative bacteria, which can be released into the circulation. In a specific embodiment, anti-C3b(i) antibodies are administered to an animal, preferably a mammal and most preferably a human, to treat or prevent septic shock. In certain embodiments, animals with increased risk of septic shock are administered a composition of the invention. Examples of such animals include, but are not limited to human burn patients, infants, immunocompromised or immunodeficient humans, and the elderly.

In a specific embodiment, one or more anti-C3(i) antibodies are administered to an animal, preferably a mammal and most preferably in human, prior to (*e.g.*, 15 minuted, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 6 hours, 12 hours, or 24 hours before), subsequent to (*e.g.*, 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 hour, 2 hours, 6 hours, 12 hours, or 24 hours after) or concomitantly with any known technique for the treatment or prevention of septic shock in said animal. Examples of known techniques for the treatment or prevention of septic shock include, but are not limited to, antithrombin, intravenous immunoglobulins, cytokine antagonists (*e.g.*, anti-tumor necrosis factor (TNF) antibodies, soluble TNF receptor, anti-interleukin-1 (IL-1) antibodies, and soluble IL-1 receptor), antibiotics, and anti-inflammatory agents. The treatment and/or prevention of septic shock includes, but is not limited to, alleviating one or more symptoms associated with one or more symptoms with septic shock and the enhancement of the immune response.

In a specific embodiment, a composition comprising a therapeutically effective amount of one or more anti-C3b(i) antibodies is administered to an animal in order to

ameliorate one or more symptoms associated with septic shock. In another embodiment, a composition comprising a therapeutically effective amount of one or more anti-C3b(i) antibodies and IgG and/or IgM enriched plasma is administered to an animal in order to ameliorate one or more symptoms associated with septic shock. In another embodiment, a composition comprising a therapeutically effective amount of one or more anti-C3b(i) antibodies and one or more complement components is administered to an animal in order to ameliorate one or more symptoms associated with septic shock. In yet another embodiment, a composition comprising a therapeutically effective amount of one or more anti-C3b(i) antibodies and one or more antibodies immunospecific for lipopolysaccharide is administered to an animal in order to ameliorate one or more symptoms associated with septic shock.

Generally, administration of products of a species origin or species reactivity (in the case of antibodies) that is the same species as that of the patient is preferred. Thus, in a preferred embodiment, human anti-C3b(i) antibodies, derivatives, analogs, or nucleic acids, are administered to a human patient for therapy or prophylaxis.

### 5.7.1. GENE THERAPY

The present invention provides methods for the treatment or prevention of cancer, viral infection, and microbial infection comprising administering nucleic acid molecules encoding one or more anti-C3b(i) antibodies. In a specific embodiment, nucleic acids comprising sequences encoding one or more anti-C3b(i) antibodies are administered to treat or prevent cancer, viral infection or microbial infection, by way of gene therapy. In another embodiment, nucleic acids comprising sequences encoding one or more anti-C3b(i) antibodies and one or more antibodies immunospecific for one or more cancer antigens are administered to treat or prevent cancer, by way of gene therapy. In another embodiment, nucleic acids comprising sequences encoding one or more anti-C3b(i) antibodies and one or more antibodies immunospecific for one or more viral or microbial antigens are administered to treat or prevent viral or microbial infection, by way of gene therapy. In yet another embodiment, nucleic acids comprising sequences encoding one or more anti-C3b(i) antibodies and one or more complement components are administered to treat or prevent cancer, viral infection, or microbial infection, by way of gene therapy. Gene therapy refers to therapy performed by the administration to a subject of an expressed or expressible nucleic acid. In this embodiment of the invention, the nucleic acids produce their encoded protein that mediates a prophylactic or therapeutic effect.

Any of the methods for gene therapy available in the art can be used according to the present invention. Exemplary methods are described below.

For general reviews of the methods of gene therapy, see Goldspiel et al., 1993, Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; and Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIBTECH 11(5):155-215). Methods commonly known in the art of recombinant DNA technology which can be used are described in Ausubel et al. (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; and Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY.

In one aspect, a composition comprising nucleic acid sequences encoding one or more anti-C3b(i) antibodies, one or more antibodies immunospecific for cancer antigens, viral antigens or microbial antigens, and/or one or more component components in an expression vector are administered to suitable hosts. The expression of nucleic acid sequences encoding anti-C3b(i) antibodies, antibodies immunospecific for cancer antigens, viral antigens or microbial antigens, and/or component components may be regulated by any inducible, constitutive, or tissue-specific promoter known to those of skill in the art. In a specific embodiment, the nucleic acid to be introduced for purposes of gene therapy comprises an inducible promoter operably linked to the coding region, such that expression of the nucleic acid is controllable by controlling the presence or absence of the appropriate inducer of transcription.

In a particular embodiment, nucleic acid molecules encoding the coding regions of anti-C3b(i) antibodies, antibodies immunospecific for cancer antigens, viral antigens or microbial antigens, and/or component components and any other desired sequences are flanked by regions that promote homologous recombination at a desired site in the genome, thus providing for intrachromosomal expression of said coding regions (Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438).

Delivery of the nucleic acids into a patient may be either direct, in which case the patient is directly exposed to the nucleic acid or nucleic acid-carrying vectors, or indirect, in which case, cells are first transformed with the nucleic acids *in vitro*, then transplanted into the patient. These two approaches are known, respectively, as *in vivo* or *ex vivo* gene therapy.

In a specific embodiment, the nucleic acid sequences are directly administered *in vivo*, where it is expressed to produce the encoded product. This can be accomplished by

any of numerous methods known in the art, *e.g.*, by constructing them as part of an appropriate nucleic acid expression vector and administering it so that they become intracellular, *e.g.*, by infection using defective or attenuated retrovirals or other viral vectors (see U.S. Patent No. 4,980,286), or by direct injection of naked DNA, or by use of microparticle bombardment (*e.g.*, a gene gun; Biolistic, Dupont), or coating with lipids or cell-surface receptors or transfecting agents, encapsulation in liposomes, microparticles, or microcapsules, or by administering them in linkage to a peptide which is known to enter the nucleus, by administering it in linkage to a ligand subject to receptor-mediated endocytosis (see, *e.g.*, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432) (which can be used to target cell types specifically expressing the receptors), etc. In another embodiment, nucleic acid-ligand complexes can be formed in which the ligand comprises a fusogenic viral peptide to disrupt endosomes, allowing the nucleic acid to avoid lysosomal degradation. In yet another embodiment, the nucleic acid can be targeted *in vivo* for cell specific uptake and expression, by targeting a specific receptor (see, *e.g.*, PCT Publications WO 92/06180 dated April 16, 1992 (Wu et al.); WO 92/22635 dated December 23, 1992 (Wilson et al.); WO92/20316 dated November 26, 1992 (Findeis et al.); WO93/14188 dated July 22, 1993 (Clarke et al.), WO 93/20221 dated October 14, 1993 (Young)). Alternatively, the nucleic acid can be introduced intracellularly and incorporated within host cell DNA for expression, by homologous recombination (Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438).

In a specific embodiment, viral vectors are used to express nucleic acid sequences. For example, a retroviral vector can be used (see Miller et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:581-599). These retroviral vectors have been to delete retroviral sequences that are not necessary for packaging of the viral genome and integration into host cell DNA. The nucleic acid sequences encoding the antibodies and/or complement components to be used in gene therapy are cloned into one or more vectors, which facilitates delivery of the gene into a patient. More detail about retroviral vectors can be found in Boesen et al., 1994, Biotherapy 6:291-302, which describes the use of a retroviral vector to deliver the mdr1 gene to hematopoietic stem cells in order to make the stem cells more resistant to chemotherapy. Other references illustrating the use of retroviral vectors in gene therapy are: Clowes et al., 1994, J. Clin. Invest. 93:644-651; Kiem et al., 1994, Blood 83:1467-1473; Salmons and Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4:129-141; and Grossman and Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114.

Adenoviruses are other viral vectors that can be used in gene therapy. Adenoviruses are especially attractive vehicles for delivering genes to respiratory epithelia. Adenoviruses

naturally infect respiratory epithelia where they cause a mild disease. Other targets for adenovirus-based delivery systems are liver, the central nervous system, endothelial cells, and muscle. Adenoviruses have the advantage of being capable of infecting non-dividing cells. Kozarsky and Wilson, 1993, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503 present a review of adenovirus-based gene therapy. Bout et al., 1994, Human Gene Therapy 5:3-10 demonstrated the use of adenovirus vectors to transfer genes to the respiratory epithelia of rhesus monkeys. Other instances of the use of adenoviruses in gene therapy can be found in Rosenfeld et al., 1991, Science 252:431-434; Rosenfeld et al., 1992, Cell 68:143-155; Mastrangeli et al., 1993, J. Clin. Invest. 91:225-234; PCT Publication WO94/12649; and Wang, et al., 1995, Gene Therapy 2:775-783. In a preferred embodiment, adenovirus vectors are used to deliver antibodies and/or complement components to an animal in accordance with methods of the invention.

Adeno-associated virus (AAV) has also been proposed for use in gene therapy (Walsh et al., 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300; U.S. Patent No. 5,436,146). In one embodiment, AAV vectors are used to delivery antibodies and/or complement components to an animal in accordance with methods of the invention.

Another approach to gene therapy involves transferring a gene to cells in tissue culture by such methods as electroporation, lipofection, calcium phosphate mediated transfection, or viral infection. Usually, the method of transfer includes the transfer of a selectable marker to the cells. The cells are then placed under selection to isolate those cells that have taken up and are expressing the transferred gene. Those cells are then delivered to a patient.

In this embodiment, the nucleic acid is introduced into a cell prior to administration *in vivo* of the resulting recombinant cell. Such introduction can be carried out by any method known in the art, including but not limited to transfection, electroporation, microinjection, infection with a viral or bacteriophage vector containing the nucleic acid sequences, cell fusion, chromosome-mediated gene transfer, microcell-mediated gene transfer, spheroplast fusion, etc. Numerous techniques are known in the art for the introduction of foreign genes into cells (see, *e.g.*, Loeffler and Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217:599-618; Cohen et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:618-644; Cline, 1985, Pharmac. Ther. 29:69-92) and may be used in accordance with the present invention, provided that the necessary developmental and physiological functions of the recipient cells are not disrupted. The technique should provide for the stable transfer of the nucleic acid to the cell, so that the nucleic acid is expressible by the cell and preferably heritable and expressible by its cell progeny.

The resulting recombinant cells can be delivered to a patient by various methods known in the art. Recombinant blood cells (*e.g.*, hematopoietic stem or progenitor cells) are preferably administered intravenously. The amount of cells envisioned for use depends on the desired effect, patient state, etc., and can be determined by one skilled in the art.

Cells into which a nucleic acid can be introduced for purposes of gene therapy encompass any desired, available cell type, and include, but are not limited to, epithelial cells, endothelial cells, keratinocytes, fibroblasts, muscle cells, hepatocytes, blood cells (*e.g.*, T lymphocytes, B lymphocytes, monocytes, macrophages, neutrophils, eosinophils, megakaryocytes, and granulocytes) and various stem or progenitor cells, in particular hematopoietic stem or progenitor cells, *e.g.*, as obtained from bone marrow, umbilical cord blood, peripheral blood, fetal liver, etc.

In a preferred embodiment, the cell used for gene therapy is autologous to the patient.

In an embodiment in which recombinant cells are used in gene therapy, nucleic acid sequences encoding anti-C3b(i) antibodies, antibodies immunospecific for cancer antigens, viral antigens or microbial antigens, and/or component components are introduced into the cells such that they are expressible by the cells or their progeny, and the recombinant cells are then administered *in vivo* for therapeutic effect. In a specific embodiment, stem or progenitor cells are used. Any stem and/or progenitor cells which can be isolated and maintained *in vitro* can potentially be used in accordance with this embodiment of the present invention (see e.g. PCT Publication WO 94/08598, dated April 28, 1994; Stemple and Anderson, 1992, *Cell* 71:973-985; Rheinwald, 1980, *Meth. Cell Bio.* 21A:229; and Pittelkow and Scott, 1986, *Mayo Clinic Proc.* 61:771).

### 5.8. DEMONSTRATION OF THERAPEUTIC OR PROPHYLACTIC UTILITY

The compositions of the invention are preferably tested *in vitro*, and then *in vivo* for the desired therapeutic or prophylactic activity, prior to use in humans. For example, *in vitro* assays to demonstrate the therapeutic or prophylactic utility of a composition include, the effect of a composition on a cell line, particularly one characteristic of a specific type of cancer, or a patient tissue sample. The effect of the composition on the cell line and/or tissue sample can be determined utilizing techniques known to those of skill in the art including, but not limited to, rosette formation assays and cell lysis assays. Test compositions can be tested for their ability to augment activated immune cells by contacting activated immune cells with a test composition or a control composition and determining the ability of the test composition to modulate the biological activity of the activated

immune cells. The ability of a test composition to modulate the biological activity of activated immune cells can be assessed by detecting the expression of cytokines or antigens, detecting the proliferation of immune cells, detecting the activation of signaling molecules, detecting the effector function of immune cells, or detecting the differentiation of immune cells. Techniques known to those of skill in the art can be used for measuring these activities. For example, cellular proliferation can be assayed by $^{3}$H-thymidine incorporation assays and trypan blue cell counts. Cytokine and antigen expression can be assayed, for example, by immunoassays including, but are not limited to, competitive and non-competitive assay systems using techniques such as western blots, immunohistochemistry radioimmunoassays, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), "sandwich" immunoassays, immunoprecipitation assays, precipitin reactions, gel diffusion precipitin reactions, immunodiffusion assays, agglutination assays, complement-fixation assays, immunoradiometric assays, fluorescent immunoassays, protein A immunoassays and FACS analysis. The activation of signaling molecules can be assayed, for example, by kinase assays and electromobility shift assays (EMSAs). The effector function of T-cells can be measured, for example, by a $^{51}$Cr-release assay (see, *e.g.*, Palladino et al., 1987, Cancer Res. 47:5074--5079 and Blachere et al., 1993, J. Immunotherapy 14:352-356).

Test composition can be tested for their ability to reduce tumor formation in patients (*i.e.*, animals) suffering from cancer. Test compositions can also be tested for their ability to reduce viral load or bacterial numbers *in vitro* and *in vivo* (*e.g.*, in patients suffering from an infectious disease) utilizing techniques known to one of skill in the art. Test compositions can also be tested for their ability to alleviate of one or more symptoms associated with cancer or an infectious disease (*e.g.*, a viral or microbial infection). Test compositions can also be tested for their ability to decrease the time course of the infectious disease. Further, test compositions can be tested for their ability to increase the survival period of patients suffering from cancer or an infectious disease (*e.g.*, a viral or microbial infection). Techniques known to those of skill in the art can be used to analyze or test the to function of the test compositions in patients.

In various embodiments, with the invention, *in vitro* assays which can be used to determine whether administration of a specific composition is indicated, include *in vitro* cell culture assays in which a patient tissue sample is grown in culture, and exposed to or otherwise administered a composition, and the effect of such composition upon the tissue sample is observed.

Compositions for use in therapy can be tested in suitable animal model systems prior to testing in humans, including but not limited to rats, mice, chicken, cows,

monkeys, rabbits, etc. For *in vivo* testing, prior to administration to humans, any animal model system known in the art may be used.

### 5.9. THERAPEUTIC/PROPHYLACTIC ADMINISTRATION AND COMPOSITION

The invention provides methods of preventing and treating cancer, viral infection, microbial infection, and septic shock by administrating to an animal (*e.g.*, cows, pigs, horses, chickens, cats, dogs, humans, etc.) an effective amount of a composition of the invention. In certain embodiments, compositions of the invention are administered to human burn patients, infants, immunocompromised or immunodeficient humans, or the elderly. Compositions of the invention include any one of the following or a combination of any of the following: one or more anti-C3b(i) antibodies, one or more antibodies immunospecific for one or more cancer antigens, one or more antibodies immunospecific for one or more viral antigens, one or more antibodies immunospecific for one or more microbial antigens, one or more complement components, nucleic acid sequences encoding one or more anti-C3b(i) antibodies, nucleic acids encoding one or more antibodies immunospecific for one or more cancer cell antigens; nucleic acids encoding one or more antibodies immunospecific for one or more viral antigens; nucleic acids encoding one or more complement components, nucleic acids encoding one or more microbial antigens, one or more antibodies immunospecific for lipopolysaccharide, an endotoxin, or a constituent of the outer wall of a gram negative bacteria, and/or nucleic acids encoding one or more antibodies immunospecific for lipopolysaccharide, an endotoxin, or a constituent of the outer wall of a gram negative bacteria. In a preferred aspect, a composition of the invention is substantially purified (*e.g.*, substantially free from substances that limit its effect or produce undesired side-effects).

Various delivery systems are known and can be used to administer a composition of the invention, *e.g.*, encapsulation in liposomes, microparticles, microcapsules, recombinant cells capable of expressing the compound, receptor-mediated endocytosis (see, *e.g.*, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construction of a nucleic acid as part of a retroviral or other vector, etc. Methods of introduction include, but are not limited to, intradermal, intramuscular, intraperitoneal, intravenous, subcutaneous, intranasal, epidural, and oral routes. The compositions may be administered by any convenient route, for example by infusion or bolus injection, by absorption through epithelial or mucocutaneous linings (*e.g.*, oral mucosa, rectal and intestinal mucosa, etc.) and may be administered together with other biologically active agents. Administration can be systemic or local. In addition, it may be desirable to introduce the compositions of the invention into the central

nervous system by any suitable route, including intraventricular and intrathecal injection; intraventricular injection may be facilitated by an intraventricular catheter, for example, attached to a reservoir, such as an Ommaya reservoir. Pulmonary administration can also be employed, *e.g.*, by use of an inhaler or nebulizer, and formulation with an aerosolizing agent.

In a specific embodiment, it may be desirable to administer the compositions of the invention locally to the area in need of treatment; this may be achieved by, for example, and not by way of limitation, local infusion during surgery, topical application, *e.g.*, in conjunction with a wound dressing after surgery, by injection, by means of a catheter, by means of a suppository, or by means of an implant, said implant being of a porous, non-porous, or gelatinous material, including membranes, such as sialastic membranes, or fibers.

In another embodiment, the composition can be delivered in a vesicle, in particular a liposome (see Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; *see* generally *ibid.*)

In yet another embodiment, the composition can be delivered in a controlled release or sustained release system. In one embodiment, a pump may be used (*see* Langer, *supra*; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). In another embodiment, polymeric materials can be used in a controlled release system (*see* Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; *see also* Levy et al., 1985, Science 228:190 ; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105). In yet another embodiment, a controlled release system can be placed in proximity of the therapeutic target (*e.g.*, the brain, kidney, stomach, pancreas, and lung), thus requiring only a fraction of the systemic dose (*see, e.g.*, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Other controlled release systems are discussed in the review by Langer (1990, Science 249:1527-1533).

In a specific embodiment where the composition of the invention is a nucleic acid encoding a protein, the nucleic acid can be administered *in vivo* to promote expression of its encoded protein, by constructing it as part of an appropriate nucleic acid expression vector and administering it so that it becomes intracellular, *e.g.*, by use of a retroviral vector (see

U.S. Patent No. 4,980,286), or by direct injection, or by use of microparticle bombardment (*e.g.*, a gene gun; Biolistic, Dupont), or coating with lipids or cell-surface receptors or transfecting agents, or by administering it in linkage to a homeobox-like peptide which is known to enter the nucleus (see *e.g.*, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868), etc. Alternatively, a nucleic acid can be introduced intracellularly and incorporated within host cell DNA for expression, by homologous recombination.

The present invention also provides pharmaceutical compositions. Such compositions comprise a prophylactically or therapeutically effective amount of one or more anti-C3b(i) antibodies, one or more antibodies immunospecific for one or more cancer antigens, one or more antibodies immunospecific for one or more viral antigens, one or more antibodies immunospecific for one or more microbial antigens, one or more complement components, or a combination thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier. In a specific embodiment, the term "pharmaceutically acceptable" means approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals, and more particularly in humans. The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the therapeutic is administered. Such pharmaceutical carriers can be sterile liquids, such as water and oils, including those of petroleum, animal, vegetable or synthetic origin, such as peanut oil, soybean oil, mineral oil, sesame oil and the like. Water is a preferred carrier when the pharmaceutical composition is administered intravenously. Saline solutions and aqueous dextrose and glycerol solutions can also be employed as liquid carriers, particularly for injectable solutions. Suitable pharmaceutical excipients include starch, glucose, lactose, sucrose, gelatin, malt, rice, flour, chalk, silica gel, sodium stearate, glycerol monostearate, talc, sodium chloride, dried skim milk, glycerol, propylene, glycol, water, ethanol and the like. The composition, if desired, can also contain minor amounts of wetting or emulsifying agents, or pH buffering agents. These compositions can take the form of solutions, suspensions, emulsion, tablets, pills, capsules, powders, sustained-release formulations and the like. The composition can be formulated as a suppository, with traditional binders and carriers such as triglycerides. Oral formulation can include standard carriers such as pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharine, cellulose, magnesium carbonate, etc. Examples of suitable pharmaceutical carriers are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin. Such compositions will contain a therapeutically effective amount of the compound, preferably in purified form, together with a suitable amount of carrier so as to

provide the form for proper administration to the patient. The formulation should suit the mode of administration.

In a preferred embodiment, the composition is formulated in accordance with routine procedures as a pharmaceutical composition adapted for intravenous administration to human beings. Typically, pharmaceutical compositions for intravenous administration are solutions in sterile isotonic aqueous buffer. Where necessary, the pharmaceutical composition may also include a solubilizing agent and a local anesthetic such as lignocaine to ease pain at the site of the injection. Generally, the ingredients are supplied either separately or mixed together in unit dosage form, for example, as a dry lyophilized powder or water free concentrate in a hermetically sealed container such as an ampoule or sachette indicating the quantity of active agent. Where the composition is to be administered by infusion, it can be dispensed with an infusion bottle containing sterile pharmaceutical grade water or saline. Where the composition is administered by injection, an ampoule of sterile water for injection or saline can be provided so that the ingredients may be mixed prior to administration.

The pharmaceutical compositions of the invention can be formulated as neutral or salt forms. Pharmaceutically acceptable salts include those formed with anions such as those derived from hydrochloric, phosphoric, acetic, oxalic, tartaric acids, etc., and those formed with cations such as those derived from sodium, potassium, ammonium, calcium, ferric hydroxides, isopropylamine, triethylamine, 2-ethylamino ethanol, histidine, procaine, etc.

The amount of a composition of the invention which will be effective in the treatment or prevention of cancer, viral infection, or microbial infection can be determined by standard clinical techniques. In addition, *in vitro* assays may optionally be employed to help identify optimal dosage ranges. The precise dose to be employed in the formulation will also depend on the route of administration, and the seriousness of the disease or disorder, and should be decided according to the judgment of the practitioner and each patient's circumstances. However, suitable dosage ranges for intravenous administration are generally about 20-500 micrograms of active compound per kilogram body weight. Suitable dosage ranges for intranasal administration are generally about 0.01 pg/kg body weight to 1 mg/kg body weight. Effective doses may be extrapolated from dose-response curves derived from *in vitro* or animal model test systems.

Suppositories generally contain active ingredient in the range of 0.5% to 10% by weight; oral formulations preferably contain 10% to 95% active ingredient.

For antibodies, the preferred dosage is 0.1 mg/kg to 100 mg/kg of body weight (generally 10 mg/kg to 20 mg/kg). If the antibody is to act in the brain, a dosage of 50 mg/kg to 100 mg/kg is usually appropriate. Generally, partially human antibodies and fully human antibodies have a longer half-life within the human body than other antibodies. Accordingly, lower dosages and less frequent administration is often possible. Modifications such as lipidation can be used to stabilize antibodies and to enhance uptake and tissue penetration (*e.g.*, into the brain). A method for lipidation of antibodies is described by Cruikshank et al., 1997, J. Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology 14:193).

The invention also provides a pharmaceutical pack or kit comprising one or more containers filled with one or more of the ingredients of the pharmaceutical compositions of the invention. Optionally associated with such container(s) can be a notice in the form prescribed by a governmental agency regulating the manufacture, use or sale of pharmaceuticals or biological products, which notice reflects approval by the agency of manufacture, use or sale for human administration.

### 5.10. DIAGNOSIS AND IMAGING OF CANCER

Labeled antibodies, derivatives and analogs thereof, which specifically bind to C3b(i) can be used for diagnostic purposes to detect, diagnose, or monitor cancer. In a preferred embodiment, anti-C3b(i) antibodies which immunospecifically bind to C3b(i) covalently bound to IgG or IgM antibodies, or C3b(i) covalently bound to a cancer cell are used for diagnostic purposes to detect, diagnosis, or monitor cancer. In a preferred embodiment, cancer is detected in the patient. The patient is an animal, preferably a mammal and most preferably a human.

In one embodiment, diagnosis is carried out by: a) administering to an animal an effective amount of a labeled molecule which immunospecifically binds to C3b(i) or C3b(i) covalently linked to a second molecule; b) waiting for a time interval following the administering for permitting the labeled molecule to preferentially concentrate at any cancerous site in the animal (and for unbound labeled molecule to be cleared to background level); c) determining background level; and d) detecting the labeled molecule in the subject, such that detection of labeled molecule above the background level indicates the presence of cancer. In one embodiment, diagnosis is carried out by: a) administering to an animal an effective amount of a labeled molecule which immunospecifically binds to C3b(i) or C3b(i) covalently linked to a second molecule prior to, subsequent to, or concomitantly with the administration of IgG antibody, IgM antibody, plasma, one or more complement

components, and/or one or more antibodies which immunospecifically bind to a cancer cell antigen; b) waiting for a time interval following the administering for permitting the labeled molecule to preferentially concentrate at any cancerous site in the animal (and for unbound labeled molecule to be cleared to background level); c) determining background level; and d) detecting the labeled molecule in the subject, such that detection of labeled molecule above the background level indicates the presence of cancer. Background level can be determined by various methods including, comparing the amount of labeled molecule detected to a standard value previously determined for a particular system.

The invention provides methods for the diagnosis or detection of cancer in an animal, said methods comprising imaging said animal at a time interval after administering to said animal an effective amount of a labeled antibody which immunospecifically binds to C3b(i) or C3b(i) covalently linked to a second molecule, said time interval being sufficient to permit the labeled antibody to preferentially concentrate at any cancerous site in said animal, wherein detection of the labeled antibody localized at the site in the subject indicates the presence of cancer. The invention also provides methods for the diagnosis or detection of cancer in an animal, said methods comprising imaging said animal at a time interval after administering to said animal an effective amount of a labeled antibody which immunospecifically binds to C3b(i) or C3b(i) covalently linked to a second molecule prior to, subsequent to, or concomitantly with the administration of IgG antibody, IgM antibody, plasma, one or more complement components, and/or one or more antibodies which immunospecifically bind to a cancer cell antigen, said time interval being sufficient to permit the labeled antibody to preferentially concentrate at any cancerous site in said animal, wherein detection of the labeled antibody localized at the site in the subject indicates the presence of cancer.

Depending on several variables, including the type of label used and the mode of administration, the time interval following the administering for permitting the labeled molecule to preferentially concentrate at any cancerous site in the subject and for unbound labeled molecule to be cleared to background level is 6 to 48 hours or 6 to 24 hours or 6 to 12 hours. In another embodiment the time interval following administration is 5 to 20 days or 5 to 10 days.

In a specific embodiment, monitoring of the cancer is carried out by repeating the method for diagnosing the cancer, for example, one month after initial diagnosis, six months after initial diagnosis, one year after initial diagnosis, etc.

In another specific embodiment of the invention, the density of a tumor facilitates the detection of said tumor using anti-C3b(i) antibodies in accordance with the methods of the invention.

U.S. patent application Serial No. 60/181,143, filed February 8, 2000, in particular page 2 of said application, is incorporated herein by reference in its entirety.

### 5.10.1. METHODS OF DETECTION AND IMAGING

Presence of the labeled molecule can be detected in the patient using methods known in the art for *in vivo* scanning. These methods depend upon the type of label used. Skilled artisans will be able to determine the appropriate method for detecting a particular label. Methods and devices that may be used in the diagnostic methods of the invention include but are not limited to: computed tomography (CT), whole body scan such as position emission tomography (PET), magnetic resonance imaging (MRI), and sonography.

In a specific embodiment, the molecule is labeled with a radioisotope and is detected in the patient using a radiation responsive surgical instrument (Thurston et al., U.S. Patent 5,441,050). In another embodiment, the molecule is labeled with a fluorescent compound and is detected in the patient using a fluorescence responsive scanning instrument. In another embodiment, the molecule is labeled with a positron emitting metal and is detected in the patent using positron emission-tomography. In yet another embodiment, the molecule is labeled with a paramagnetic label and is detected in a patient using magnetic resonance imaging (MRI).

### 5.11. KITS

The present invention also provides kits that can be used in the above methods. In one embodiment, a kit comprises one or more antibodies immunospecific for C3b(i) or C3b(i) linked (*e.g.*, covalently linked) to a second molecule, in one or more containers. In another embodiment, a kit comprises one or more antibodies immunospecific for C3b(i) or C3b(i) linked (*e.g.*, covalently linked) to a second molecule and IgM antibody, in one or more containers. In another embodiment, a kit comprises one or more antibodies immunospecific for C3b(i) or C3b(i) linked (*e.g.*, covalently linked) to a second molecule and IgG antibody, in one or more containers. In another embodiment, a kit comprises one or more antibodies immunospecific for C3b(i) or C3b(i)linked (*e.g.*, covalently linked) to a second molecule and one or more complement components, in one or more containers. In another embodiment, a kit comprises one or more antibodies immunospecific for C3b(i) or C3b(i) linked (*e.g.*, covalently linked) to a second molecule and one or more antibodies

immunospecific for one or more cancer cell antigens, viral antigens, or microbial antigens, in one or more containers. In another embodiment, a kit comprises one or more antibodies immunospecific for C3b(i) or C3b(i) linked (*e.g.*, covalently linked) to a second molecule, IgM or IgG antibody, and one or more complement components in one or more containers. In yet another embodiment, a kit comprises one or more antibodies immunospecific for C3b(i) or C3b(i) linked (*e.g.*, covalently linked) to a second molecule, one or more antibodies immunospecific for one or more cancer cell antigens, viral antigens or microbial antigens, and one or more complement components, in one or more containers.

Preferably, the kits of the present invention further comprise a control antibody which is not immunospecific for C3b(i) or C3b(i) linked (*e.g.*, covalently linked) to a second molecule. In a specific embodiment, the kits of the present invention contain a labeled C3b(i) immunospecific antibody. In a preferred embodiment, the kits of the invention contain a C3b(i) immunospecific antibody conjugated to a therapeutic agent. In another preferred embodiment, the kits of the present invention contain a C3b(i) specific antibody conjugated to a diagnostic agent. In yet another preferred embodiment, the kits of the present invention contain a purified C3b(i) immunospecific antibody. In yet another embodiment, the kits of the present invention contain anti-C3b(i) antibodies which immunospecifically bind to C3b(i) covalently bound to IgG or IgM antibody, or C3b(i) covalently bound to a cancer cell, virus, or microbe.

In certain embodiments, the kits of the invention contain instructions for the use of the antibodies for the treatment, prevention or diagnosis of cancer, viral infections, or microbial infections.

## 6. EXAMPLE: C3b(i) AS A TUMOR-SPECIFIC ANTIGEN

The following example demonstrates that after opsonization of prostate tumor cells, C3b(i) can function as a tumor-specific antigen. Antibodies specific for C3b(i) can be utilized to target tumor cells for the delivery of therapeutic or diagnostic agents, including cytotoxic, chemotherapeutic, immune-enhancing drugs, radioactive compounds, genetic material and immune effector cells.

LNCaP and lineage-derived C4-2 human prostate cancer cell lines were utilized in this example to demonstrate the use of C3b(i) as a target for immunotherapy. The LNCaP/C4-2 progression model recapitulates progression of human neoplastic prostate disease from an androgen-responsive and minimally metastatic (LNCaP cells) to an androgen-refractory (defined as being able to proliferate in castrate hosts) and highly aggressive phenotype (C4-2 subline) (Thalmann et al., 1994, Canc. Res. 54:2577-81;

Chung et al., 1996, Urol. Oncol. 2:99-128; Hyytinen et al., 1997, Br. J. Cane. 75:190-5). It shares remarkable similarities with clinical human prostate cancer both in its genotypic and phenotypic changes. Furthermore, the LNCaP/C4-2 progression model has been shown to be a powerful tool for evaluating anti-prostate cancer therapeutic approaches both *in vitro* and *in vivo* (Chung et al., 1997, Acta Urol. Jap. 43:815-20), especially with regard to hormone-refractory disease, for which few effective or durable treatment options currently exist (Scher et al., 1994, Sem Oncol 21:630-56).

### 6.1. MATERIALS AND METHODS

Cell lines and Serum Specimens

LNCaP (American Type Culture Collection, Rockville, MD) and C4-2 (Urocor, Oklahoma City, OK) human prostate cancer cell lines were maintained in T-media with 5% heat inactivated fetal bovine serum (FBS; Gibco, Grand Island, NY). Cultures were maintained at 37°C in humidified 5% $CO_2$, split and harvested at 80 to 90% confluence, and treated, if applicable, at 25% confluence. Cells were collected using either phosphate buffered saline (PBS) with 2.5 mM ethylenediitrilotetraacetic acid (EDTA; Sigma, St. Louis, MO) or trypsin (Gibco, Grand Island, NY) diluted 1:10 in phosphate buffered saline (PBS). Samples were then washed twice in PBS by centrifugation at 450 g for 2 minutes and resuspended at a final concentration of 0.2-1 X $10^7$ cells/ml in PBS with 1% bovine serum albumin (BSA-PBS).

Serum samples were obtained with written informed consent from normal male and female volunteers (University of Virginia, Charlottesville, VA) and from men being followed for prostate disease (University of Virginia and Eastern Virginia Medical School, Norfolk, VA). Prostate disease patients had pathologic documentation of either benign or neoplastic prostate disease. Blood was drawn into SST gel and clot activator Vacutainer tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), held at room temperature for 30 min, and then centrifuged for 20 min at 700 X g to obtain serum which was stored at -80°C.

Serum Opsonization of Tumor Cells

Harvested LNCaP and C4-2 tumor cells (1 X $10^7$ cells/ml in BSA-PBS) were mixed with an equal volume of freshly thawed serum and gently shaken for 20 mm at 37°C. The opsonized cells were washed twice and brought to a final concentration of 1 X $10^7$ cells/ml in BSA-PBS. Alternative opsonization procedures included addition of 10 mM EDTA to sera to block all complement activation (or use of EDTA-containing plasma), addition of 10 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) and 5 mM Mg (Mg-EGTA) to allow only

alternative pathway activation, use of purified IgM (1 mg/ml, Sigma, St. Louis, MO), or use of IgM-depleted serum. In this case, IgM was removed from normal human sera (NHS) by incubating 2.5 ml of serum with 1.65 ml (settled volume) anti-human IgM agarose (Sigma, St. Louis, MO) on ice for 1 hr with gentle shaking. The depleted serum was separated from the agarose by centrifugation at 1600 X *g* and then stored at -80°C. ELISA determinations (not shown) demonstrated that >90% of the human IgM was specifically removed from the serum by this procedure, but the level of human IgG was reduced by less than 10%.

Monoclonal Antibodies

IgG1 mAb 7C12, 2H11, and 8E11, specific for C3b(i); IgG1 mAb HB57, specific for human 1gM; and IgG2a mAb 7G9, specific for human complement receptor 1 (CR1), have been previously reported (Ferguson et al., 1995, Arthritis Rheum 38:190; Taylor et al., 1989, J. Immunol. 143:3626; and Tosic et al., 1989, J. Immunol. Methods 120:241) and were used in parallel with isotype-matched controls. Anti-C3b(i) mAb 3E7 (IgG1), which bound to a different epitope and was not blocked by the other anti-C3b(i) mAb, was prepared by our previously described methods (Tosic et al., 1989, J. Immunol. Methods 120:241). The specificity of mAb 3E7 for C3b(i) was confirmed by indirect flow cytometry as follows. Both mAb 3E7 and 7C12 bound to serum-opsonized pig erythrocytes, as revealed by fluorescein-isothiocyanate(FITC)-labeled anti-mouse IgG. In the presence of 5 µg/ml purified, heat-treated (56°C) C3 (Quidel, San Diego, CA), binding of the mAb to opsonized pig erythrocytes was reduced by 88% and 62% respectively (results not shown). Radiolabeling of mAb with $^{125}$I was performed by the Iodogen procedure (Edberg et al., 1988, J. Immunol. 141:4258; and Fraker et al., 1978, Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:849). A bispecific mAb complex (a heteropolymer) was prepared by cross-linking mAb 3E7 with mAb 7G9 (Segal et al., 1995, Curr Protocol Immunol 2:131; and Taylor et al., 1997, J. Immunol. 97:842).

Serum opsonization of tumor cells

Harvested LNCaP and C4-2 tumor cells (approx. 5 x $10^6$ cells/ml in BSA-PBS) were mixed with an equal volume of freshly thawed serum and gently shaken for 20-30 mm at 37°C. The opsonized cells were washed twice and brought to a final concentration of 5 x $10^6$ cells/ ml in BSA/PBS. Alternative opsonization procedures included addition of 10 mM EDTA to sera or the use of EDTA-containing plasma to block all complement activation, addition of 10 mM [ethylenebis (oxonitrilo)]-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA) and 5 mM $Mg^{+2}$ (MgEGTA) to allow only alternative pathway activation, the use of purified

IgM (1 mg/ml, Sigma, St. Louis, MO), or the use of IgM-depleted serum. In the latter case, IgM was removed from NHS by incubating 2.5 ml serum with 1.65 ml (settled volume) anti-(human IgM) linked to agarose (Sigma, St. Louis, Mo.) on ice for 1 h with gentle shaking. The depleted serum was separated from the agarose by centrifugation at 1,600 g and then stored at -80°C. Enzyme-linked immunosorbent assay determinations (not shown) demonstrated that more than 90% of the human IgM was specifically removed from the serum by this procedure, but the level of human IgG was reduced by less than 10%.

Flow cytometry and radioimmunoassays

Opsonized cancer cells were probed with FITC-labeled goat anti-(human IgM) Fc5μ (Pierce, Rockford, Ill.), FITC-labeled goat anti-human IgG Fc (Accurate, Westbury, N.Y.), or a cocktail of the anti-C3b(i) mAb 7C12 and 8E11 (typically 200 ng each mAb/$10^6$ cells) followed by a secondary FITC-labeled goat anti-mouse IgG (Sigma, St. Louis, MO). All incubations were at 37°C for 20 min in BSA-PBS. Controls included non-opsonized cells and irrelevant isotype-matched mAb. In selected cases, cells were stained with propidium iodide (Sigma, St. Louis, MO) used at a final concentration of 2 μg/ml in BSA/PBS for 5 min, in the dark, on ice, to ascertain IgM or C3b-opsonization of the viable cell populations only. Viability was usually above 75%. One- or two-color fluorescence analysis was performed with CellQuest software on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Studies of the binding of $^{125}$I-labeled anti-C3b(i) and anti-human IgM mAb to cancer cells followed previously published procedures (Edberg et al., 1988, J. Immunol. 141:4258; and Taylor et al., 1989, J. Immunol. 143:3626). Briefly, after opsonization, 5 x $10^6$ cancer cells were incubated for 20-30 min with $^{125}$I-labeled mAb 7C12, 8E11, 3E7, or HB57 (final concentrations between 0.1 μg/ml and 10 μg/ml) or matched-isotype controls. As a separate control for background binding, naive cancer cells were incubated with the $^{125}$I-labeled mAb. The level of binding of the mAb to the cancer cells was then determined by centrifuging the sample through oil and measuring radioactive counts in the cell pellets (Ross et al., 1985, J. Immunol. 135:2005). Alternatively, in order to determine if the anti-C3b(i) mAb could bind to cancer cells *during* complement opsonization, $^{125}$I-labeled mAb 3E7 or 7C12 was added directly to the incubation mixture containing cancer cells and NHS. After incubation at 37°C, the cells were spun through oil to measure mAb binding.

Rosette experiments

Samples of 10 µl 50% suspension of human erythrocytes (approximately 5 x $10^7$ cells) in either BSA/PBS or plasma were incubated with 2 x $10^4$ LNCaP cells (either non-opsonized, or serum- opsonized as described above) in the presence or absence of 20 ng anti-CR1 x anti-C3b(i)(7G9 x 3E7) heteropolymer. After 30 min at 37°C, the cell mixtures were resuspended in BSA-PBS at a final concentration of 1% erythrocytes. Light microscopy was used to evaluate the presence and extent of erythrocyte/tumor-cell rosetting.

Immunohistochemistry

Paraffinized tissue sections with defined histopathology were deparaffinized treated with 3% hydrogen peroxide, blocked with Super Block (Scytek Laboratories, Logan, Utah), and then treated with Avidin/Biotin Block (Vector Laboratories Inc., Burlingame, Calif.). Fixed sections were incubated with 4 µg/ml anti-C3b(i) IgGlmAb 7C12 and 8E11 overnight at 4°C, followed by biotinylated goat anti-mouse IgG and peroxidase-conjugated streptavidin (Biogenex Laboratories, San Ramon, CA). Subsequently, 3-amino-9-ethylcarbazole/$H_2O_2$ was used as the peroxidase substrate. Mouse IgG1 was used as a negative control for staining. The presence and extent of immunohistochemical staining was evaluated by light microscopy.

Magnetic purging of cancer cells: analyses by radioimmunoassay (RIA)

Anti-C3b(i) mAb 2H1 I (which recognizes the same epitope bound by mAb 7C12 (Tosic et al., 1989, J. Immunol. Methods 120:241) or mAb 3E7 was covalently coupled to amine-terminated BioMag particles (Polysciences Inc., Warrington, PA) following the manufacturer's instructions. Cancer cells were labeled with $^{51}Cr$ (Ferguson et al., 1995, Arthritis Rheum 38:190), opsonized with an equal volume of NHS, washed three times and then subjected to the magnetic purging protocols (see below). For experiments with blood cells in serum, blood was collected into EDTA, the cells were washed three times and re-constituted into serum (or into plasma/EDTA as a control), and then $^{51}Cr$-labeled cancer cells were added. Alternatively, in certain experiments, $^{51}Cr$-labeled cancer cells (approx. 50,000 cells) were first mixed with aliquots of whole blood anti-coagulated in EDTA (complement activation is prevented) or in citrate (partially permissive for complement activation). After opsonization the samples were washed three times. More than 80% of the $^{51}Cr$ label was retained by the cancer cells in all opsonization procedures.

After the opsonization steps, 25 µl containing 5 x $10^4$ cancer cells corresponding to approx. 50,000 cpm were incubated with 100 µl BioMag particles containing approx. 100

μg anti-C3b(i) mAb, or a control irrelevant IgG antibody (goat anti-(mouse IgG) or sheep anti-FITC). After an incubation of 30 min on ice, the mixtures were placed in the Polysciences BioMag 15-ml separation unit, and 7 ml BSA/PBS was added to increase the volume of the separated (unbound) supernatant. This separation procedure was repeated two more times. Material bound to the magnetic particles was counted for $^{51}Cr$ and, after a centrifugation step, pelleted material from the unbound supernatant (representing intact but unbound cells) was counted for $^{51}Cr$ as well, in order to calculate the percentage of intact cells bound to the beads. Approximately 90%-95% of the initial input level of cell-associated $^{51}Cr$ was found in either the pelleted supernatants or was directly bound to the particles.

Effects of purging on normal cells: analyses by flow cytometry

In order to determine the effects of purging on normal cells, the same procedures, which included opsonization, washing, and reaction with the BioMag particles, were performed on aliquots of whole blood and on blood cells reconstituted in serum. In these experiments the aliquots were not mixed with $^{51}Cr$-labeled cancer cells in order to avoid possible contamination of the flow cytometer with radioactivity. After the whole blood samples had been processed, they were assayed by flow cytometry with a number of standard markers (see below). Finally, we obtained blood samples that were enriched for CD34-positive cells from a leukophoresis of an oncology patient at the University of Virginia who was being treated with granulocyte-colony-stimulating factor in preparation for autologous stem cell transplantation. These samples were diluted into blood-type-matched whole blood from a normal individual (containing citrate or EDTA), or were added to washed blood cells reconstituted with serum, and subjected to the same opsonization and purging protocols.

After purging, unbound cellular fractions were reconstituted to the starting volumes and examined by flow cytometry following the manufacturers' directions for use of the developing reagents. The Becton Dickinson Multitest reagent (CN 340499, CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCp/CD4 APC) was used to analyze for CD3/CD4-and CD3/CD8-positive lymphocytes. Light-scattering profiles of CD45-positive cells were used in the same experiment to count granulocytes. In separate experiments we measured CD34-positive cells by dual gating on CD45 (PerCp, BD 347474) and CD34 (APC, BD 340441, isotype control BD 340442). CD14 positive cells were identified by dual gating on CD45 and CD14 (FITC, Caltag, Burlingame, Calif., MHCDI401, isotype control MG2a01). In these

measurements FluorCount Fluorospheres (Coulter, Miami, Fla., PN 2547053) were used to normalize sample volumes.

Radioimmunotherapy cytotoxicity studies

The cytotoxic effects of $^{131}$I-labeled anti-C3b(i) (7C12 and 8E11) mAbs on the LNCaP and C4-2 prostate cancer cell lines were evaluated as follows. 1 X $10^6$ cells of each prostate cancer cell line were opsonized with 25% NHS (diluted in BSA-PBS) or maintained in BSA-PBS at 37°C for 30 min. After washing twice with PBS, either 2 ug or 200 ng of $^{131}$I-labeled 7C12+8E11 or $^{131}$I-labeled irrelevant mAb (diluted in BSA-PBS) was added to each set of cells and incubated at room temperature for 30 min. The cells were washed twice with PBS, and plated in triplicate in 24-well tissue culture plates (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) in T-media + 5% FBS at 3 X$10^4$ cells per well. The plates were then placed in a humidified environment at 37°C with 5% $CO_2$. A single media change was performed on day 3. On 5 (LNCaP) and 6 (C4-2) subsequent days, beginning 24 hr after mAb treatment, the triplicate wells were harvested to evaluate cell killing by comparing differences in 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide (MTT) (Sigma, St. Louis, MO) assay results.

## 6.2. RESULTS

C3b(i) and IgM are deposited on prostate cancer cells

Opsonization of C4-2 prostate cancer cells (and LNCaP, see below) with normal human serum (NHS) results in deposition of substantial amounts of C3b(i) on the cells. In the representative flow-cytometry experiment displayed in FIG. 1, the effect of C3b(i) opsonization by NHS on C4-2 cells is shown in the top panel (FIG. 1A). Similar results were obtained with sera from 8 other normal individuals (data not shown). C3b(i) deposition appears to be facilitated by activation of both the classical and alternative complement pathways, but considerably less C3b(i) is demonstrable when Mg-EGTA, which allows for alternative pathway activation only, is added to the serum. Moreover, opsonization with NHS provides a source of IgM specific for the cancer cells (Fig. 1B). IgM is more readily revealed on the cancer cells when the experiment is conducted under conditions (Mg-EGTA) that block the classical pathway of complement activation, as C3b deposition via the classical pathway seems to partially block epitopes on IgM (see Table 1, below). The flow cytometry results also demonstrate that, after opsonization with serum from a prostate cancer patient, significantly less C3b(i) and IgM are deposited on the tumor cells (FIG. 1C, D). It is noteworthy, however, that C3b(i) deposition via the alternative

pathway (Mg-EGTA-treated serum) is comparable for both the normal and cancer patient serum, suggesting that the alternative pathway of complement activation remains intact in serum from prostate cancer patients.

IgM binding promotes robust cancer cell opsonization with C3b(i)

On the basis of classic studies of the mechanisms of antibody-mediated complement activation (Borsos et al., 1965, Science 150:505; Circolo et al., 1985, Mol. Immunol. 22:207; and Schreiber et al., 1972, J. Clin. Invest. 51:583), it was hypothesized that the observed complement activation on the cancer cells was predominantly facilitated by the binding of serum IgM to these cells. To isolate the effects of IgM, affinity chromatography was used to remove IgM from NHS under conditions that preserve the complement activity of the serum. Both RIA and flow cytometry demonstrate that, when IgM-depleted serum is used to opsonize LNCaP or C4-2 cells, substantially less C3b(i) is deposited on the cancer cells (FIG. 2). Normal levels of C3b(i) deposition can be restored, however, when cancer cells are first incubated with whole normal human plasma containing EDTA, which blocks both classical and alternative complement pathways. Thus, the intact plasma provides a source of human IgM sufficient to allow for robust deposition of C3b(i) on the cancer cells after they have been washed and subsequently reacted with the IgM-depleted serum, which serves as a source of complement. RIA analysis further confirms that treatment of the cancer cells with purified IgM followed by treatment with IgM-depleted serum as a complement source also results in enhanced deposition of C3b(i) on the cancer cells (*FIG.* 2B).

Next, the number of available epitopes on serum-opsonized cancer cells that can be targeted by anti-C3b(i) mAb was measured. Dose-response studies were performed under several conditions to estimate the number of C3b(i) sites that are generated on the cells after opsonization with NHS. The results displayed in FIG. 3 indicate that complement activation can produce in excess of 100,000 C3b(i) epitopes per cell after correction for background. It is well-known that large amounts of C3b and its breakdown products are also generated in solution during complement activation by immune complexes even if they are on cell surfaces or particulates (Circolo et al., 1984, Mol. Immunol. 21:191; Edberg et al., 1988, J. Immunol. 141 4258; and Gadd et al., 1981, Biochem J. 195:471), and it would be reasonable to anticipate that these fragments could compete for binding to the anti-C3b(i) mAb, depending upon the exact specificity of these mAb. In fact, in most experiments binding of $^{125}$I-labeled mAb 7C12 was reduced, within experimental error, to background levels when it was present during the opsonization step. For example, radioactivity bound

(used to calculate molecules bound) was 6,700 ± 100 cpm for 3 μg/ml mAb 7C12 added to the washed cells; the corresponding value for the "during" protocol was 90 ± 100 cpm. Background labeling (no opsonization) was 900 ± 100 cpm. However, $^{125}$I-labelled mAb 3E7 is still able to bind to the cancer cells even when it is present during the opsonization step. Moreover, in certain cases, at high input concentrations (FIG. 3B; 10μg/ml), this mAb appears to enhance the net deposition of C3b fragments on the cancer cells. Inhibition studies (see materials and methods) with purified heat-treated C3 confirmed the specificity of mAb 3E7 for C3b(i). These findings indicate that mAb 3E7 binds preferentially to C3b(i) located on the opsonized cancer cell, and is less susceptible than mAb 7C12 to inhibition by C3b(i) fragments in the medium.

**Table 1**. C3b(i) deposition on C4-2 cells by sera from two different normal donors partially blocks the detection of human IgM by both flow cytometry and radioimmunoassay

| Treatment | Log mean fluorescence intensity* | | Number of bound $^{125}$I-mAb | |
|---|---|---|---|---|
| | Anti-C3b(i) | Anti-(human IgM) | Anti-C3b(i) mAb 8E11 (*mean ± SD*) | Anti-human IgM) mAb HB57 (*mean ± SD*) |
| No serum | 7.5 | 4.7 | 1,200 ± 270 | 850 ± 30 |
| Serum | 266 | 14.8 | 27,700 ± 70 | 3,100 ± 60 |
| Serum + EDTA | 9.1 | 36.8 | 880 ± 100 | 7,900 ± 30 |
| Serum + MgEGTA | 55.6 | 29.3 | 12,000 ± 50 | 7,300 ± 330 |

* Same data presented in Fig. 1

The data strongly suggests that natural human IgM binds to surface antigens on cancer cells and facilitates activation of the classical pathway, thus allowing for deposition of large amounts of human C3b(i) on the cells. However, following complement activation and C3b(i) deposition, relatively diminished levels of cancer-cell-bound IgM can be demonstrated by flow cytometry and RIA (FIG. 1 and Table 1). This is probably due to the fact that once C3b(i) becomes covalently linked to IgM, epitopes on the IgM molecule are obstructed by C3b(i), thereby preventing the binding of anti-IgM antibodies used for flow cytometry and RIA. Deposition of C3b fragments on human IgM in immune complexes has been demonstrated in several reports (Mehta et al., 1986, J. Immunol. 136:1765; Taylor et al., 1989, J. Immunol. 143:3626; and Thornton et al., 1996, Clin. Exp. Immunol. 104:531). Therefore, some C3b(i) is complexed to the IgM on the cancer cell, and it is likely that C3b(i) is also covalently attached to glycoproteins and glycolipids on the cancer cell.

The representative data in FIG. 1 indicates that the serum from a man with prostate cancer was less effective than NHS in depositing C3b(i) on cancer cells. Several studies have previously demonstrated that the amount of IgM that can bind to cancer cells is reduced in the sera of cancer patients (Desai et al., 1995, J. Immunol. Methods 188:175; Dillman, R.O., 1994, J. Clin. Oncol. 12:1497; Gross et al., 1988, Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 24:363; Higuchi et al., 1980, J. Clin. Lab. Immunol. 4:141; and Seegal et al., 1976, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 52:205). To independently confirm these findings, sera from a number of normal individuals and men with prostate cancer were surveyed to evaluate differences in the levels of anti-tumor IgM. The experiments were conducted with sera containing 0.01 M EDTA to remove the presumed confounding and blocking effect of C3b(i) in detecting cancer-cell-bound IgM. The results, displayed in FIG. 4, indicate that in two of three experiments the level of IgM bound by cancer cells was significantly greater in normal sera than in that from prostate cancer patients. The third experiment approaches significance and might have reached it if not for the small number of samples in the control group. In one of the surveys, we assayed for cancer-cell bound IgG in addition to IgM. As shown in FIG. 4, little if any IgG in NHS is bound to the cancer cells. However, sera from some of the cancer patients show a notable titer, revealed by the large standard deviation in the patients' group. Although the numbers are too small to draw definite conclusions, these results do suggest the possibility of an active antitumor immune response in some of the cancer patients. Elevated tumor-specific IgG in patients with cancer has been previously reported (Vetvicka et al., 1997, J. Immunol. 159:599).

C3b(i) deposition is tumor cell-specific

To determine the cancer-tissue specificity of the C3b(i) epitope, frozen-sectioned prostate tissue specimens with anti-C3b(i) mAb were immunohistochemically stained. The surgical specimens from 2 men undergoing transurethral resection for benign prostatic hypertrophy were used as a control. Neither control demonstrated immunohistochemical evidence of anti-C3b(i) mAb binding (FIG. 5A). Conversely, of the thirty specimens from men with prostate cancer, eight (61%) stained positively for anti-C3b(i) mAb (FIG. 5B). Furthermore, in these eight specimens, only areas of malignancy were stained; regions containing a predominance of benign cells remained negative. In only 2 specimens was staining of extremely high intensity, implying that, although complement is deposited on prostate cancer cells, inherent host complement deposition by itself provides suboptimal opsonization and systemic infusions with IgM (in the form of plasma) from normal donors may be of benefit.

Erythrocytes rosette with opsonized tumor cells in the presence of specific anti-CR1 x anti-C3b(i) heteropolymer

One current application for mAb in cancer immunotherapy involves the generation of bispecific reagents in which a mAb specific for a cancer cell antigen is cross-linked with a mAb specific for an effector site (*e.g.*, Fc receptors on monocytes/macrophages, granulocytes, or natural killer cells) (Renner et al., 1995, Immunol. Rev. 145:179; and Segal DM, Bakacs T, Jost CR, Kuruez I, Sconocchia G, Titus JA (1995) T-cell targeted cytotoxicity. In: Fanger MW (ed) Bispecific antibodies. Landis. Austin, Tex, p 27-42). In this approach, immunocompetent cells can be delivered directly, and specifically, to a tumor via the guidance of the anti tumor mAb. A prototype for this approach was examined by testing whether human erythrocytes could bind to C3b(i)-opsonized cancer cells through bispecific mAb complexes (heteropolymers) specific for C3b(i) and the primate erythrocyte complement receptor (CR1). As demonstrated in FIG. 6, rosettes consisting of erythrocytes completely surrounding the opsonized tumor cells are formed in normal human plasma after addition of the heteropolymer. In contrast, in the absence of anti-C3b(i)-specific heteropolymer, the majority of opsonized tumor cells bind no erythrocytes and a small percentage bind only two or three erythrocytes, because of a small amount of CR1-mediated immune adherence (not shown) (Okada et al., 1974, Nature 248:521). Finally, no rosettes were obtained if erythrocytes and heteropolymer were incubated with naive cancer cells (not shown).

Complement-opsonized cancer cells can be purged by immunomagnetic methods

One of the more recent immunotherapeutic approaches to treatment of many forms of cancer involves the purging of cancer cells from autologous bone marrow or peripheral stem cells before autologous transplantation (Tyer et al., 1996, Clin. Cancer Res. 2:81). Although this method is not currently used as a therapy for prostate cancer, the use of prostate cancer cells is a reasonable test of the potential feasibility of using complement and anti-C3b(i) mAb to remove cancer cells selectively from solution. This approach is particularly attractive because opsonized cancer cells can be washed before addition of coupled mAb, eliminating solution-phase competition by C3b(i) fragments. As shown in Table 2, opsonization of both LNCaP and C4-2 cells with NHS followed by treatment with anti-C3b(i) mAb of different specificities bound to BioMag particles leads to very efficient binding and removal of the cancer cells. It is noteworthy that mAb 3E7, which binds to the cancer cells during serum opsonization, did not block purging with mAb 2H11 (Table 2).

**Table 2** Removal of C3b(i) opsonized cancer cells by magnetic purging with anti-C3b(i) mAb. Results are means ± SD

| Cell type | Cells removed (%) | | Conditions |
|---|---|---|---|
| | Naive | Opsonized | |
| LNCaP | 13 ± 4 | 99.0 ± 0.2 | $AB^+$ serum, 2H11 beads |
| C4-2 | 4 ± 2 | 98.0 ± 0.3 | $AB^+$ serum, 2H11 beads |
| C4-2 | 15 ± 1 | 98.0 ± 0.2 | $O^-$ serum, 2H11 beads |
| C4-2 | 11 ± 1 | 96.0 ± 0.1 | $O^-$ serum, 2H11 beads mAb 3E7 present during opsonization |
| LNCaP | 18 ± 3 | 98 ± 1 | $O^+$ serum, 3E7 beads |
| LNCaP | 21 ± 2 | 99.0 ± 0.3 | $O^+$ serum, 3E7 beads 2% hematocrit[a] |
| LNCaP | 20 ± 5 | 96 ± 1 | $O^+$ serum, 3E7 beads 50% hematocrit[b] |

[a] Whole blood was washed three times, and the cells reconstituted to 2% hematocrit with 50% serum

[b] Whole blood was washed three times, and the cells reconstituted to 50% hematocrit with serum

Robust and specific binding is demonstrable when the experiment is conducted in a reconstituted system that approximates whole blood and allows for complement activation (Table 3). When the whole-blood experiment is conducted in EDTA, which blocks complement activation, binding of the C4-2 cells to the anti-C3b(i) beads is reduced to background levels. Experiments conducted with whole blood under the two conditions that allow complement activation (serum, or citrated plasma) demonstrated a high level of binding of the C4-2 cells to the mAb 3E7 magnetic beads (Table 3). Similar experiments with reconstituted blood samples spiked with CD34-positive cells to facilitate detection by flow cytometry revealed that CD34-positive cells are not removed by the anti-C3b(i)-coated beads (3E7) after complement activation (Table 3), although there was apparently some non-specific binding of the cells to both types of bead for all conditions. Flow-cytometric analyses (Table 4) of the effect of anti-C3b magnetic bead purging on normal cells indicate no specific removal of $CD4^+$ or $CD8^+$ T lymphocytes, or granulocytes. $CD14^+$ monocytes treated with serum showed some reduction compared to controls. This reduction was not observed in citrated plasma.

**Table 3** Effects of purging on cancer and progenitor cells in whole blood. The results for targeting of C4-2 cancer cells are based on $^{51}Cr$-labeled cells. The retention was determined by flow-cytometric analysis of samples spiked with $CD34^+$ cells. Results are means ± SD.

| Conditions | Targeting of C4-2 cancer cells: removal (%) | | Retention of $CD34^+$ cells after purging cells/µl) | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 3E7 beads | IgG beads | 3E7 beads | IgG beads | No beads |
| 50% serum[a] | 98 ± 1 | 3 ± 0.3 | 6.5 ± 1 | 6.5 ± 2 | 17 ± 5 |
| 50% serum[a] | 8 ± 1 | 5 ± 0.5 | | | |
| Citrate[b] | 84 ± 8 | 9 ± 3 | 11 ± 2 | 8 ± 1 | 21 ± 1 |
| EDTA[b] | 10 ± 5 | 13 ± 3 | 8 ± 2 | 11 ± 3 | 20 ± 2 |

[a] Whole blood was washed three times, and the cells reconstituted to 50^ hematocrit with serum or plasma
[b] Whole blood anti-coagulated with citrate or EDTA

**Table 4** Flow-cytometric analyses of the effects of purging on populations of T lymphocytes, granulocytes and monocytes. Whole blood anti-coagulated with citrate or EDTA was used or washed blood cells were reconstituted to 50% hematocrit in serum. *3E7* anti-C3b(i)-coated magnetic beads, *IgG* beads coated with a control irrelevant antibody.

| Conditions | Cell population (cells/µl) | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | CD3/CD4 | | | CD3/CD8 | | | Granulocytes | | | CD14 | | |
| Bead: | 3E7 | IgG | None | 3E7 | IgG | None | 3E7 | IgG | None | 3E7 | IgG | None |
| 50% serum | 730 | 65 | 730 | 370 | 330 | 370 | 2,900 | 3,3 | 3,00 | 280 | 400 | 620 |
| Citrate, expt. 1 | 750 ± 60 | 0 | 900 | 380 ± 30 | 340 | 470 | 3,400 ± 500 | 00 | 0 | 500 | 530 | 540 |
| Citrate, expt. 2 | 600 | 66 | 800 | ND | ND | 560 | ND | 3,5 | 3,50 | ND | ND | ND |
| EDTA, expt. 1 | 790 | 0 | 910 | 370 | 370 | 480 | 2,700 | 00 | 0 | 370 | 410 | 580 |
| EDTA, expt. 2 | 630 | N D | 760 | 420 | ND | 490 | 3,000 | ND | 2,90 | ND | ND | ND |
| | | | | 420 | | | 3,500 | 3,2 | 0 | | | |
| | | 68 | | | | | | 50 | 3,30 | | | |
| | | 0 | | | | | | ND | 0 | | | |
| | | N | | | | | | | 3,40 | | | |
| | | D | | | | | | | 0 | | | |

By flow-cytometry experiments several other cancer cell lines, including astrocytoma (U-87 MG; ATCC), breast cancer (MDA-MB-231;ATCC), colon cancer (LoVo; ATCC), lung cancer (CCD-16Lu; ATCC), and osteosarcoma (MG-63; ATCC) were efficiently opsonized with C3b(i) by the AB-positive serum used to obtain the results shown

in FIG. 1A. More than 94% of the cells registered as positive after opsonization, compared to a background level (before opsonization) of less than 5% (not shown).

Radiolabeled anti-C3b(i) mAbs can kill prostate cancer cells *in vitro*

Another application of cancer-specific mAbs involves the coupling of radioactive agents to the mAbs to allow for the imaging or destruction of tumors (Glennie MJ, French RR. Targeting drugs, toxins, and radionuclides with bispecific antibodies. In: Fanger MW, editor. Bispecific Antibodies. ed. Austin: RG Landis Co.; 1995, p. 107-20). The potential of this approach was examined by labeling anti-C3b(i) mAbs with $^{131}I$, and then testing their effectiveness in killing cancer cells in culture. After serum opsonization and reaction with the radiolabeled mAbs in solution phase (see Methods), the cells were plated. In all cases the experiments included both serum-opsonized and naive cells, as well as radiolabeled isotype-matched irrelevant mAbs. Although the level of cytotoxicity was modest, progressive killing of serum opsonized LNCaP and C4-2 cells by the $^{131}I$-labeled anti-C3b(i) mAbs over a period of 3 to 6 days was demonstrated (FIG. 7). Cell death was not observed in control cultures consisting of either nonopsonized tumor cells or $^{131}I$-labeled irrelevant mAb-treated cells. LNCaP and C4-2 prostate cancer cells opsonized and treated with mAbs after being plated in tissue culture wells demonstrated similar patterns of killing (data not shown).

### 6.3. DISCUSSION

It has long been recognized that C3b and its fragments can deposit on the surface of cancer cells in patients with tumors (Okada et al., 1974, Nature 248:521-25; Irie et al., 1974, Science 186:454-456.;Vetvicka et al., 1996, J. Clin. Invest. 98:50-61; Vetvicka V et al., 1997, J. Immunol. 159:599-605; and Vetvicka et al., 1999, Clin. Exp. Immunol. 115:229-35). This reaction is facilitated by natural IgM. Investigations by Springer and others suggest that the natural IgM repertoire recognizes cancer cell-associated carbohydrate epitopes which are not found on normal tissue (Hakomori et al., 1996, Canc. Res. 56:5309-18; Castronovo et al., 1989, J. Nat. Canc. Inst. 81:212-6; Springer et al., 1984, Science 224:1198-206; Springer et al., 1997, J. Mol. Med. 75;594-602; and Desai et al., 1995, J. Immunol. Methods 188:175-85). In fact, several investigators are using carbohydrate epitopes as vaccines to induce an active immune response to certain cancers ( Springer, 1984, Science 224:1198-206; Springer, 1997, J. Mol. Med. 75;594-602; Livingston et al., 1997, Canc. Immunol. Immunotherapy 43 :324-30; and Zhang et al., 1998, Canc. Res. 58:2844-9). The findings presented herein demonstrate the utility of deposited C3b(i) as a

tumor-associated membrane antigen with which to design a general diagnostic and therapeutic modality.

Large amounts of C3b(i) have been shown to specifically deposit on cancer cells after opsonization with NHS (FIGS. 1, 2 and 3 and Table 1). As indicated in Figures 1 and 4, the level of the presumably protective IgM is often reduced in cancer patients, including those with breast tumors (Desai et al., 1995, J. Immunol. Methods 188:175-85; Seegal et al., 1976, Int. Arch. Allergy App. Immunol. 52:205-11; Higuchi et al., 1980, J. Lab Chin. Immunol. 5:407-18; and Gross et al., 1988, Eur. J. Canc. Chin. Oncol. 24:363-7). Therefore, the infusion of normal human plasma in some cancer patients will help to restore or enhance C3b(i) opsonization of tumor sites accessible to the bloodstream. However, even if normal human plasma deposits a large quantity of C3b(i) on the cancer cell surface, it is unlikely that this action alone will be sufficient to eradicate a tumor, since cancer cells often express high levels of complement control proteins (Gorter et al., 1996, Lab. Invest. 74:1039-49; Maenpaa et al., 1996, Am J Path 148:1139-52; and Li et al.., 1997, Int. J. Canc. 71:1049-55). For example, the expression of CD59 ("protectin") by cancer cells blocks the action of the membrane attack complex which might otherwise lyse the cancer cell. The results presented herein demonstrate that one approach to treating cancer is to infuse a patient with normal human plasma (to supply IgM and, if necessary, complement) and to then deliver systemically anti-neoplastic agents to the cancer cells by conjugating the agents to anti-C3b(i) mAbs, which would circulate through the body and home to sites of opsonized tumor cells.

To ensure that a sufficient quantity of therapeutic agent is delivered in close proximity to the tumor cell, mAb-based immunotherapy for cancer requires a very high level of selective and high avidity binding of the mAb to the tumor. The results indicate that at least 50,000 C3b(i) epitopes are available on opsonized prostate cancer cells and, based on the *in vitro* killing studies, this level of cancer-associated antigen should be sufficient for specific targeting of the cancer cell, enabling the delivery of abundant therapeutic or diagnostic agents.

Tumor tissue-specific delivery of therapeutic agents is crucial to avoid undesirable injury to healthy tissue. In the case of C3b(i) as a target, it is important that complement activation be limited to tumor cells. Except for a few relatively rare disease conditions (Rosse et al., 1995, Blood 86;3277-86; Morgan BP. Complement: clinical aspects and relevance to disease. ed. London: Harcourt Brace Jovanovich; 1990), the complement system is highly regulated and C3b(i) is not deposited on normal tissue. Moreover, C3b(i) deposition has been shown to be confined to areas of malignancy in human prostate tissue

specimens, and is absent in benign (FIG. 5A) and hyperplastic regions (not shown). These data confirm earlier studies on breast cancer, which established a similar tumor tissue-specific pattern of opsonization (Vetvicka et al., 1997, J. Immunol. 159:599-605; Howard et al., 1979, Cancer 43:2279-87; and Niculescu et al., 1992, Am. J. Path. 140:1039-43).

Due to normal turnover, a small fraction of circulating C3 expresses antigenic epitopes similar to C3b(i), and this endogenous C3b(i)-like molecule might block the action of the anti-C3b(i) mAbs (Mollnes et al., 1987, J. Immunol. Methods 101;201-7; Petronis et al., 1998, Clin. Nuc. Med. 23:672-7). Generation of C3b fragments in the solution phase during complement activation would also tend to block binding of the mAb to cancer cells, and indeed mAb 7C12 binds to the C3b-opsonized cancer cells only after they are washed (not shown). C3b(i) covalently linked directly to IgM or to a carbohydrate on the cancer cell should, however, contain unique and specific antigenic determinants different from those expressed by C3b fragments in solution, and it should be possible to generate mAb specific for such cell-associated molecules. Indeed mAb 3E7, which was able to bind to the cancer cells during the opsonization step (Fig. 3), did not block purging with the 2H11 beads (Table 2). It is likely that other mAb can be developed that will demonstrate even greater binding specificity for C3b(i) covalently bound to the cancer cells.

The feasibility of an *ex vivo* application in which anti-C3b(i) mAb can be used to target and purge complement-opsonized cancer cells, which are first washed to remove potentially competing soluble C3b(i) fragments has been demonstrated (Tables 2 and 3). The procedure appears to spare normal cells including CD34-positive cells (Tables 3 and 4), which are most representative of progenitor cells (Bensinger, W.I., 1998, Bone Marrow Transplant 21:113; LaCasse et al., 1999, Blood 94:2901; and Vescio et al., 1999, Blood 93:1858). The therapeutic efficacy of purging for autologous transplantation remains controversial (Bensinger, W.I., 1998, Bone Marrow Transplant 21:113). It is reasonable to believe that contaminating cancer cells may indeed promote tumor resurgence after autologous transplantation (Schneiderman et al., 1998, Radiat Res 149:147; and Vescio et al., 1999, Blood 93:1858) and, as noted by Bensiger (1998, Bone Marrow Transplant 21:113), carefully controlled trials will be required to determine the efficacy of purging protocols. Several other new methods for purging cancer cells from bone marrow or stem cell preparations have recently been reported (LaCasse et al., 1999, Blood 94:2901; Lazzaro et al., 1995, Exp. Hematol. 23:1347; and Schneiderman et al., 1998, Radiat Res 149:147), and C3b(i) targeting may provide a powerful orthogonal approach. Use of these procedures in tandem with C3b(i)-based targeting may allow for highly efficacious purging of cancer cells from bone marrow or peripheral blood stem cells before autologous transplantation.

The potential use of anti-C3b(i) mAb in bispecific mAb complexes bound to either erythrocytes or immune effector cells (Gast et al., 1997, Cancer Immunol. Immunother. 45:121; Renner et al., 1995, Immunol. Rev. 145:179; Segal DM, Bakacs T, Jost CR, Kuruez I, Sconocchia G, Titus JA (1995) T-cell targeted cytotoxicity. In: Fanger MW (ed) Bispecific antibodies. Landis. Austin, Tex, p 27-42; and Taylor et al., 1997, Cancer Immunol. Immunother. 45:152) is illustrated by our rosetting data (FIG. 6). In the presence of the anti-C3b(i) x anti-CR1 heteropolymer, erythrocytes completely encircled prostate tumor cells opsonized with human serum. Circulating "micrometastatic" prostate tumor cells have been demonstrated in men with prostate cancer of varying grades and stages (Sokoloff et al., 1996, Cancer 77:1862). In one possible therapeutic approach, anti-C3b(i) heteropolymer constructs could be infused into men with prostate cancer in conjunction with, or soon after an infusion of normal serum, in order to target the tumor cells.

Once the tumor cells are opsonized, anti-C3b(i) mAbs coupled with toxic agents or radioisotopes can be administered to individuals. The potential use of this approach is illustrated in FIG. 7. When LNCaP and C4-2 cells were treated with $^{131}$I-labeled specific anti-C3b(i) mAbs, only those cells that had been opsonized with NHS prior to treatment with the $^{131}$I-anti-C3b(i) mAbs were killed (FIG. 7). This approach can also be utilized for diagnostic imaging purposes, similar to the PROSTASCINT™ scan, when tumor cell deposits are effectively opsonized and then targeted with anti-C3b(i) mAb-conjugated compounds (Petronis et al., 1998, Clin. Nuc. Med. 23:672-7).

The results herein demonstrate that while opsonization with normal human serum results in the deposition of large amounts of IgM and C3b(i) on prostate cancer cells, opsonization with sera from most men with prostate cancer leads to substantially diminished levels of cell-associated IgM and C3b(i). This deficiency can be restored by the infusion of normal plasma as a source of human IgM which will ultimately allow for the opsonization of cancer cells with C3b(i). These opsonized cells will therefore present unique and specific antigenic determinants for targeting by appropriate C3b(i) mAbs.

## 7. EXAMPLE: EFFECT OF ANTIGEN SPECIFIC ANTIBODIES ON THE ABILITY OF ANTI-C3b(i) ANTIBODIES TO BIND TO RED BLOOD CELLS

The following example demonstrates that the presence of an antibody that immunospecifically binds to a cancer antigen increases the ability of opsonized tumor cells to bind to erythrocytes in the presence of bispecific monoclonal antibody (heteropolymer) for C3b(i) and the complement receptor CR1.

**Materials & Methods**

In certain experiments, $^{51}$Cr-labeled Raji cells (model for B cell lymphoma) were dispersed in either serum or in serum containing 0.01 M EDTA (which blocks complement activation). They were incubated for 30 minutes at 37°C in the presence or absence of 5 μg/ml Rituximab (Genentech, CA), to allow C3b(i) deposition. The cells were then washed three times and redispersed in normal human plasma containing human red cells at a 50 % hematocrit. In two cases the incubation mixture also contained a bispecific monoclonal antibody for C3b(i) and the complement component CR1 (HP7G9X3E7; "HP") at a concentration of 3 μg/ml. After another 30 minute incubation, 100 μl aliquots of the samples were layered on 1 ml of ficoll-hypaque and centrifuged at 500 X g for 15 minutes. The $^{51}$Cr counts associated with the Raji cellls were then measured in the E pellet, and in the supernatant, which is the region in which free Raji cells are found.

In other experiments, $^{51}$Cr-labeled Raji cells were added to washed whole blood which was reconstituted in fresh serum. The samples were incubated for 30 minutes at 37°C in the presence of varying combinations of reagents: 5 μg/ml Rituximab; 3 μg/ml HP; Rituximab plus HP incubated together; Rituximab added 15 minutes before HP; and HP added 15 minutes before Rituximab. After another 30 minute incubation, duplicate 200 μl aliquots of the samples were layered on 1 ml of ficoll-hypaque and centrifuged at 500 X g for 15 minutes. The $^{51}$Cr counts associated with the Raji cellls were then measured in the E pellet, and in the supernatant, which is the region in which free Raji cells are found.

**Results**

As shown in FIGS. 9 and 10, a larger percentage Rajii cells bound to erythrocytes when the Rajii cells were opsonized by serum or whole blood reconstituted in serum and Rituximab in the presence of the heteropolymer than when the Rajii cells were opsonized by serum or whole blood reconstituted in serum and Rituximab in the absence of the heteropolymer. Also, a larger percentage Rajii cells bound to erythrocytes when the Rajii cells were opsonized by serum or whole blood reconstituted in serum and Rituximab in the presence of the heteropolymer than when the Rajii cells were opsonized with serum alone or whole blood reconstituted in serum alone in the presence of the heteropolymer (FIGS. 9 and 10). Further, as shown in FIG. 10, comparable numbers of Rajii cells bound to erythrocytes when the Rajii cells were opsonized with whole blood reconstituted in serum and Rituximab in presence of the heteropolymer regardless of whether the Rituximab and heteropolymer were added to the Rajii cells concomitantly or either of them was added first. Similar results were obtained with whole blood that has not been washed. These results

suggest that the addition of an antibody immunospecific for a cancer cell antigen may enhance the therapeutic effect that anti-C3b(i) antibodies in cancer patients.

## 8. EXAMPLE: SERUM-MEDIATED BINDING OF BACTERIA TO ERYTHROCYTES

Two gram negative bacteria, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa,* both of which can cause sepsis, were used to assess the ability of bacteria in the presence of serum to bind to erythrocytes. As shown in Table 2, in the presence of normal serum, these bacteria can activate complement, covalently capture C3b, and then bind to primate erythrocytes *via* their complement receptor 1 (CR1) which is immunospecific for C3b, the first complement activation product. Binding in sample buffers (1% BSA in phosphate buffered saline) or in serum or plasma containing EDTA (to block complement activation) averaged <15% for *E. coli,* and <12% for *P. aeruginosa.* It is important to note that only a fraction of the bacteria bind to the erythrocytes, and with time binding actually decreases (see Table 5). One possible explanation for the decrease is that C3b bound to the bacteria is converted to further breakdown products, C3bi and C3dg, and the primate erythrocyte complement receptor does not bind these ligands with any measurable affinity.

**Table 5.** Serum-Mediated Binding of Bacteria to Erythrocytes at 37°C is Time-Dependent

| | Percentage Of Bacteria Bound to Erythrocytes | |
|---|---|---|
| Time (mins) | *E. coli* | *P. aeruginosa* |
| 5 | 50 | 34 |
| 20 | 75 | 85 |
| 60 | 48 | 39 |
| 120 | 22 | 15 |

## 9. EXAMPLE: THE EFFECT OF BISPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES ON THE ABILITY OF *P. AERUGINOSA* TO BIND TO ERYTHROCYTES

The following example demonstrates that bispecific antibodies for CR1 and C3b(i) enhance the ability of *Pseudomonas aeruginosa* to bind to erythrocytes in the presence of serum.

Green fluorescent (GP) *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) was incubated for varying periods of time at 37°C with 7G9x2H4 (a bispecific monoclonal antibody for complement receptor CR1 and a *Pseudomonas aeruginosa* antigen), 7G9x7C12 (a bispecific monoclonal antibody for complement receptor CR1 and C3b(i)), 7G9x3E7 (a bispecific monoclonal antibody for complement receptor CR1 and C3b(i)), or no heteropolymer (HP) and normal human serum containing human erythrocytes at a 30-50 % hematocrit. Following an incubation period, aliquots of the samples were diluted 100 fold and the binding of GP *P. aeruginosa* to erythrocytes was detected by flow cytometry. The percentage of bound erythrocytes was then calculated based upon the number of bound and free GP *P. aeruginosa* detected using flow cytometry. In experiment 1, a concentration of 8 μg/ml of 7G9x2H4, 7G9x7C12, or 7G9x3E7 was incubated with GP *P. aeruginosa* and erythrocytes. In this experiment, erythrocytes outnumbered the GP *P. aeruginosa* 50:1. In experiment 2, a concentration of 1.3 μg/ml of 7G9x2H4 or 7G9x3E7 was incubated with GP *P. aeruginosa* and erythrocytes. In this experiment, erythrocytes outnumbered the GP *P. aeruginosa* 10:1. In experiment 3, a concentration of 1.3 μg/ml of 7G9x2H4 or 7G9x3E7 was incubated with GP *P. aeruginosa* and erythrocytes. In this experiment, erythrocytes outnumbered the GP *P. aeruginosa* 5,000:1.

As shown in Table 6 *infra*, a larger percentage of GP *P. aeruginosa* bound to erythrocytes when incubated together for 15 minutes or more in the presence of the bispecific monoclonal antibodies than when incubated together in the absence of heteropolymer. Also, the percentage of GP *P. aeruginosa* bound to erythrocytes in the presence of 7G9x2H4 was comparable to the percentage of GP *P. aeruginosa* bound to erythrocytes in the presence of 7G9x3E7. These results suggest that an antibody immunospecific for C3b(i) is capable of binding to microbes such as *P. aeruginosa* in serum containing complement components as well as or almost as well as an antibody immunospecific for a particular microbial antigen. Thus, these results suggest the therapeutic usefulness of anti-C3b(i) antibodies in treatment of microbial infections.

**Table 6.** Heteropolymers Specific for *P. aeuruginosa* or Cb(i) Enhance Binding to Erythrocytes in the Presence of Serum

| | Percentage of *P. aeruginosa* Bound to Erythrocytes | | | |
|---|---|---|---|---|
| Time (mins) | No HP | 7G9x2H4 | 7G9x7C12 | 7G9x3E7 |
| *10 | 87 | 83 | 84 | 93 |
| *30 | 81 | 98 | 92 | 97 |
| *90 | 47 | 97 | 82 | 98 |
| **15 | 65 | 82 | ND | 82 |
| **90 | 32 | 70 | ND | 81 |
| ***10 | 98 | 98 | ND | 98 |
| ***60 | 91 | 93 | ND | 98 |

(*) Experiment 1; (**) Experiment 2; (***) Experiment 3; (ND) not determined

The present invention is not to be limited in scope by the exemplified embodiments, which are intended as illustrations of single aspects of the invention. Indeed, various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and accompanying drawings. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

All publications cited herein are incorporated by reference in their entirety.

**What is claimed is:**

1. A composition for use in ameliorating one or more symptoms associated with cancer in an animal, said composition comprising a prophylactically or therapeutically effective amount of one or more anti-C3b(i) antibodies and Herceptin®, Retuxan®, OvaRex, Panorex, BEC2, IMC-C225, Vitaxin, Campath I/H, Smart MI95, LymphoCide, Smart I D10, or Oncolym.

2. The composition of claim 1 further comprising IgG enriched plasma.

3. The composition of claim 1 or 2 further comprising IgM enriched plasma.

4. The composition of claim 1 or 2 further comprising one or more complement components.

5. The composition of claim 3 further comprising one or more complement components.

6. A composition for use in ameliorating one or more symptoms associated with cancer in an animal, said composition comprising a prophylactically or therapeutically effective amount of one or more nucleic acid sequences encoding one or more anti-C3(i) antibodies and one or more nucleic acid sequences encoding Herceptin®, Retuxan®, OvaRex, Panorex, BEC2, IMC-C225, Vitaxin, Campath I/H, Smart MI95, LymphoCide, Smart I D10, or Oncolym.

7. The composition of claim 6 further comprising one or more nucleic acid sequences encoding one or more complement components.

8. The composition of claim 6 or 7 further comprising IgG enriched plasma.

9. The composition of claim 6 further comprising IgM enriched plasma.

10. The composition of claim 8 further comprising IgM enriched plasma.

11. The composition of claim 8 further comprising one or more nucleic acid sequences encoding one or more complement components.

12. The composition of Claim 1 or 6, wherein at least one of the anti-C3b(i) antibodies is immunospecific specific for C3b(i) linked to IgM or IgG bound to cancer cells.

13. The composition of Claim 1 or 6, wherein at least one of the anti-C3b(i) antibodies is immunospecific for C3b(i) linked to proteins or lipids on cancer cells.

14. The composition of claim 1 or 6 in which at least one of the anti-C3b(i) antibodies is a monoclonal antibody or Fab fragment.

15. The composition of Claim 1 or 6, wherein at least one of the anti-C3b(i) antibodies is a bispecific antibody which is immunospecific for C3b(i) and an effector cell receptor or antigen.

16. The composition of claim 15 in which the effector cell is a lymphocyte, monocyte, macrophage, dendritic cell, neutrophil, natural killer cell or erythrocyte.

17. The composition of claim 16 in which the effector cell is an erythrocyte.

18. The composition of claim 17 in which the antigen is CR1, CR2, CR3, CR4, CD16, CD32, CD64 or CD89.

19. The composition of claim 15 wherein the bispecific antibody is bound *ex vivo* to the effector cell.

20. The composition of claim 1 in which at least one of the anti-C3b(i) antibodies is conjugated to a therapeutic agent.

21. The composition of claim 1 or 6 in which the animal is a human.

22. The composition of claim 1 or 6 in which the monoclonal antibody is a human or humanized monoclonal antibody.

23. The composition of claim 1 or 6, wherein at least one of the antibodies is Retuxan®.

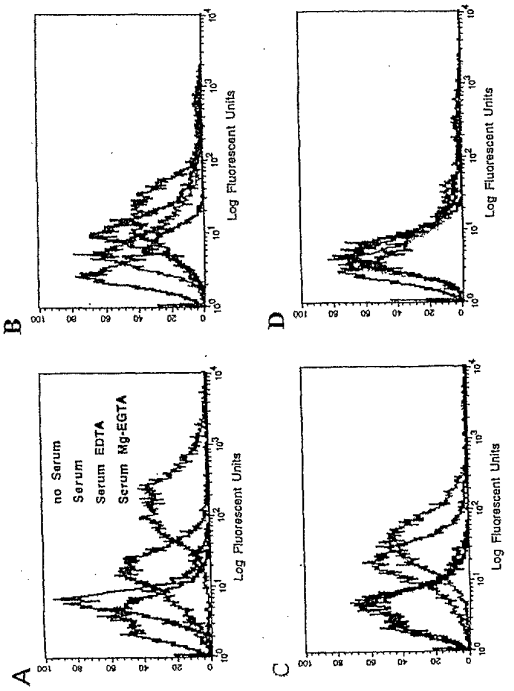

A
B
C
D
no Serum
Serum
Serum EDTA
Serum Mg-EGTA
Log Fluorescent Units

FIG. 1

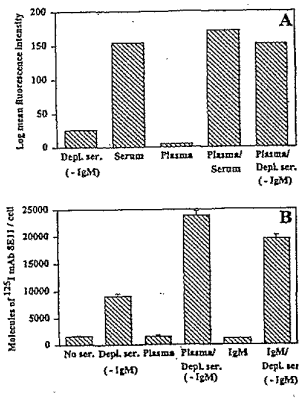

A
Log mean fluorescence intensity
200
150
100
50
0
Depl. ser. (-IgM)
Serum
Plasma
Plasma/ Serum
Plasma/ Depl. ser. (-IgM)
B
Molecules of 125I mAb SE11 / cell
25000
20000
15000
10000
5000
0
No ser.
Depl. ser. (-IgM)
Plasma
Plasma/ Depl. ser. (-IgM)
IgM
IgM/ Depl. ser (-IgM)

FIG. 2

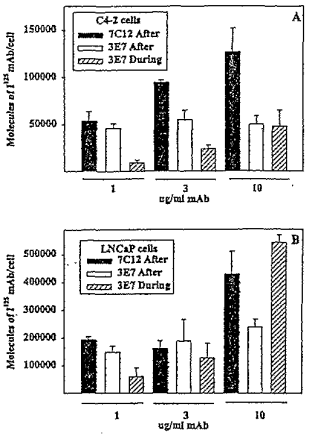

A
C4-2 cells
7C12 After
3E7 After
3E7 During
150000
100000
50000
1
3
10
ug/ml mAb
B
LNCaP cells
7C12 After
3E7 After
3E7 During
500000
400000
300000
200000
100000
1
3
10
ug/ml mAb

FIG. 3

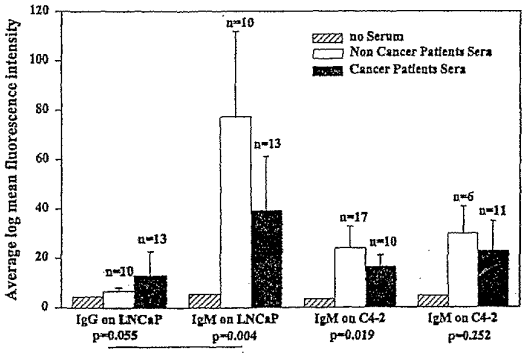

Average log mean fluorescence intensity
120
100
80
60
40
20
0
no Serum
Non Cancer Patients Sera
Cancer Patients Sera
n=10
n=13
n=10
n=13
n=17
n=10
n=6
n=11
IgG on LNCaP
p=0.055
IgM on LNCaP
p=0.004
IgM on C4-2
p=0.019
IgM on C4-2
p=0.252

FIG. 4

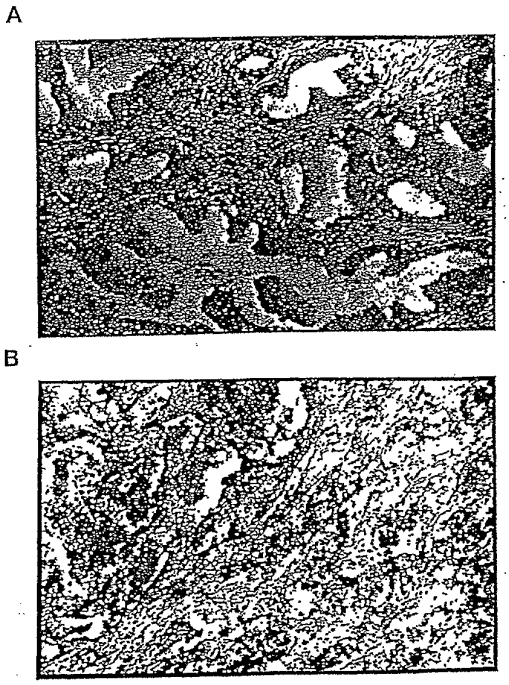



FIG. 5

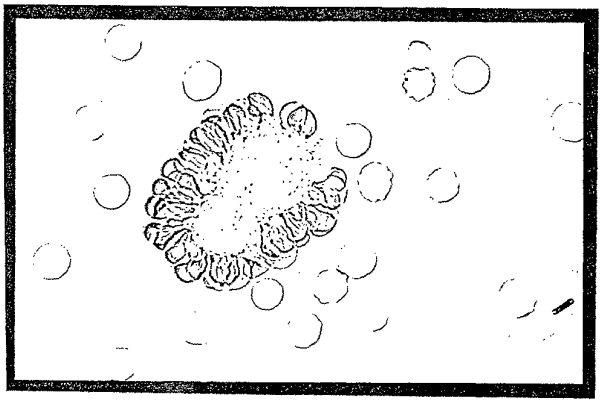


FIG. 6

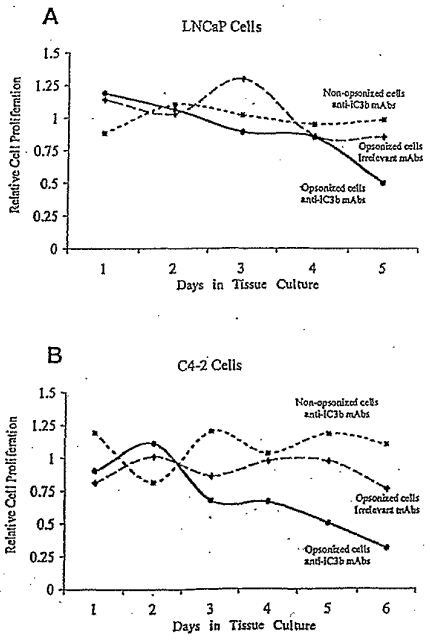

A
LNCaP Cells
Relative Cell Proliferation
1.5
1.25
1
0.75
0.5
0.25
0
1
2
3
4
5
Days in Tissue Culture
Non-opsonized cells anti-IC3b mAbs
Opsonized cells Irrelevant mAbs
Opsonized cells anti-IC3b mAbs
B
C4-2 Cells
Relative Cell Proliferation
1.5
1.25
1
0.75
0.5
0.25
0
1
2
3
4
5
6
Days in Tissue Culture
Non-opsonized cells anti-IC3b mAbs
Opsonized cells Irrelevant mAbs
Opsonized cells anti-IC3b mAbs

FIG. 7

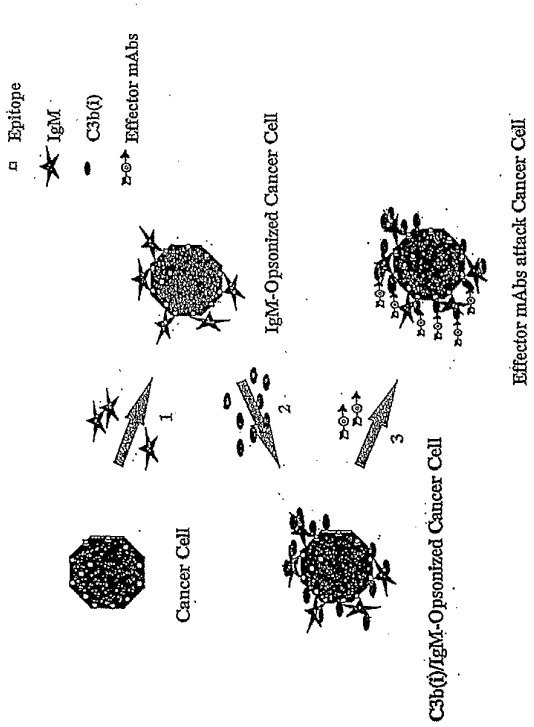

Epitope
IgM
C3b(i)
Effector mAbs
Cancer Cell
IgM-Opsonized Cancer Cell
C3b(i)/IgM-Opsonized Cancer Cell
Effector mAbs attack Cancer Cell
1
2
3

FIG. 8

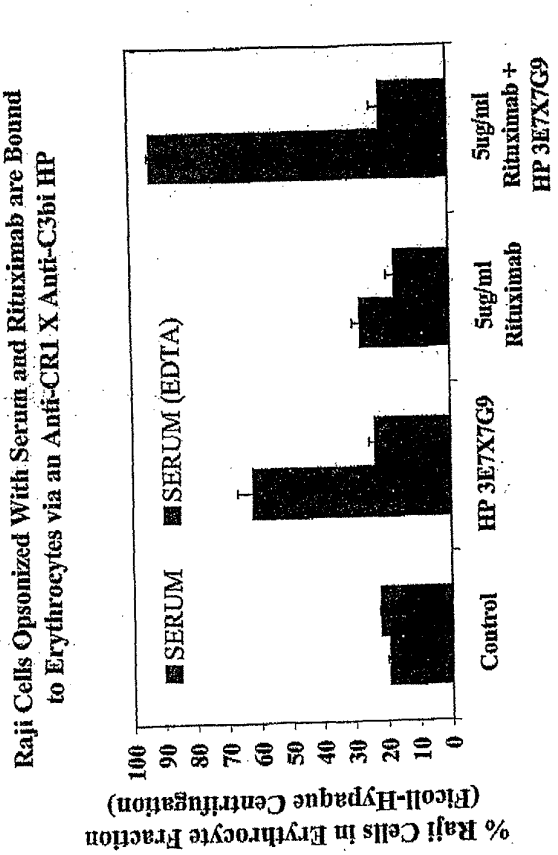

Raji Cells Opsonized With Serum and Rituximab are Bound to Erythrocytes via an Anti-CR1 X Anti-C3bi HP
% Raji Cells in Erythrocyte Fraction (Ficoll-Hypaque Centrifugation)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
SERUM
SERUM (EDTA)
Control
HP 3E7X7G9
5ug/ml Rituximab
5ug/ml Rituximab + HP 3E7X7G9

FIG. 9

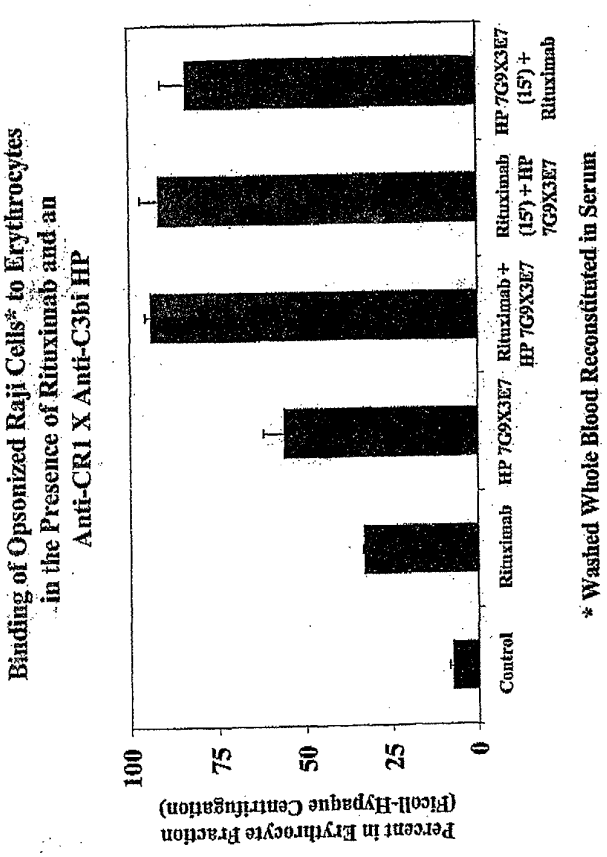

Binding of Opsonized Raji Cells* to Erythrocytes
in the Presence of Rituximab and an
Anti-CR1 X Anti-C3bi HP
Percent in Erythrocyte Fraction
(Ficoll-Hypaque Centrifugation)
100
75
50
25
0
Control
Rituximab
HP 7G9X3E7
Rituximab + HP 7G9X3E7
Rituximab (15') + HP 7G9X3E7
HP 7G9X3E7 (15') + Rituximab
* Washed Whole Blood Reconstituted in Serum

FIG. 10

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
6 June 2002 (06.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/043570 A3

(51) International Patent Classification⁷: A61K 39/395, C07K 16/18, 16/46

(21) International Application Number: PCT/US01/44813

(22) International Filing Date:
28 November 2001 (28.11.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/724,620 28 November 2000 (28.11.2000) US

(71) Applicant: **UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION** [US/US]; Towers Office Building, Suite 1-110, 1224 West Main Street, Charlottesville, VA 22903 (US).

(72) Inventors: **TAYLOR, Ronald**; 108 Kerry Lane, Charlottesville, VA 22901 (US). **NARDIN, Alessandra**; 12, rue de Langeac, F-75015 Paris (FR). **SUTHERLAND, William, M.**; 4275 Viewmont Road, Earlysville, VA 22936 (US). **SOKOLOFF, Mitchell, H.**; 620 South Garfield Avenue, Hindsdale, IL 60521 (US). **CHUNG, Leland, W., K.**; 1111 Rocky Road, Lovingston, VA 22949 (US).

(74) Agents: **BALDWIN, Geraldine, F.** et al.; Pennie & Edmonds LLP, 1155 Avenue of the Americas, New York, NY 10036 (US).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, 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, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Published:**
— *with international search report*
— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

(88) Date of publication of the international search report:
10 July 2003

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

WO 02/043570 A3

(54) **Title:** METHODS FOR THE PREVENTION AND TREATMENT OF CANCER USING ANTI-C3B(i) ANTIBODIES

(57) **Abstract:** The present invention relates to methods of treating and preventing cancer in an animal comprising administrating to said animal antibodies specific for C3b(i). The present invention also realtes to methods of treating and preventing cancer in an animal comprising administering to said animal IgG antbodies, IgM antibodies and/or complement components in combination with antibodies immunospecifically bind to one or more cancer cell antigens in combination with antibodies immunospecific for C3b(i). The present invention further relates to pharmaceutical compositions for the treatment and prevention of cancer comprising one or more antibodies immunospecific for C3b(i) and one or more antibodies immunospecific for one or more cancer cell antigens.

【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/44813

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**
IPC(7) : A61K 39/395; C07K 16/18, 16/46
US CL : 424/130.1, 178.1
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)
U.S. : 424/130.1, 178.1

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 practicable, search terms used)
Medline, Biosis, Cancerlit, Lifesci, Biotechds, Caplus on STN. APS on West

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | US 5,322,699 A (WRIGHT et al0 21 June 1994 (21.06.1994). See entire document. | 1-23 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family 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 application or patent 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 |
|---|---|
| 20 April 2003 (20.04.20030 | 02 MAY 2003 |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Commissioner of Patents and Trademarks<br>Box PCT<br>Washington, D.C. 20231<br>Facsimile No. (703)305-3230 | Authorized officer<br>Anthony Caputa<br>Telephone No. 703-308-0196 |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

| (51)Int.Cl.[7] | FI | テーマコード（参考） |
|---|---|---|
| Ａ６１Ｐ 31/04 | Ａ６１Ｐ 13/10 | |
| Ａ６１Ｐ 31/12 | Ａ６１Ｐ 31/04 | |
| Ａ６１Ｐ 35/00 | Ａ６１Ｐ 31/12 | |
| Ａ６１Ｐ 35/02 | Ａ６１Ｐ 35/00 | |
| | Ａ６１Ｐ 35/02 | |
| | Ａ６１Ｋ 37/02 | |

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,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,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 テイラー，ロナルド
アメリカ合衆国 ２２９０１ バージニア州，シャルロッツビル，ケリー レーン １０８
(72)発明者 ナーディン，アレッサンドラ
フランス国 エフ－７５０１５ パリ，ル ド ランゲアック，１２
(72)発明者 サザーランド，ウィリアム，エム.
アメリカ合衆国 ２２９３６ バージニア州，アーリーズヴィル，ビューモント ロード ４２７５
(72)発明者 ソコロフ，ミッチェル，エイチ.
アメリカ合衆国 ６０５２１ イリノイ州，ヒンズデール，サウス ガーフィールド アベニュー ６２０
(72)発明者 チュン，レランド，ダブリュ.，ケー.
アメリカ合衆国 ２２９４９ バージニア州，ロヴィングストン，ロッキー ロード １１１１

Ｆターム(参考) 4C084 AA01 AA02 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 CA17 CA18 CA36
DC50 NA14 ZA811 ZA812 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZB331 ZB332
ZB351 ZB352
4C085 AA13 AA14 AA33 BB36 CC03 CC04 EE01
4C087 AA01 AA02 BB35 CA21 NA14 ZA81 ZB26 ZB27 ZB33 ZB35