

(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2009-504659
(P2009-504659A)

(43) 公表日 平成21年2月5日(2009.2.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/26 (2006.01)	C07K 16/26	2G045
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
A61K 39/395 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B065
A61K 31/7088 (2006.01)	A61K 39/395 N	4C084
A61K 48/00 (2006.01)	A61K 31/7088	4C085
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 67 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-526153 (P2008-526153)
 (86) (22) 出願日 平成18年8月8日 (2006.8.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年4月3日 (2008.4.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/030988
 (87) 国際公開番号 W02007/019541
 (87) 国際公開日 平成19年2月15日 (2007.2.15)
 (31) 優先権主張番号 60/706,506
 (32) 優先日 平成17年8月8日 (2005.8.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

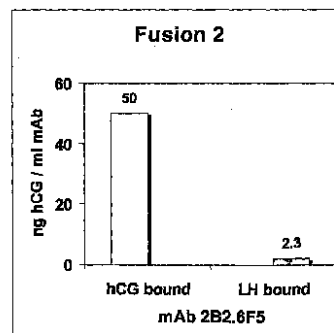
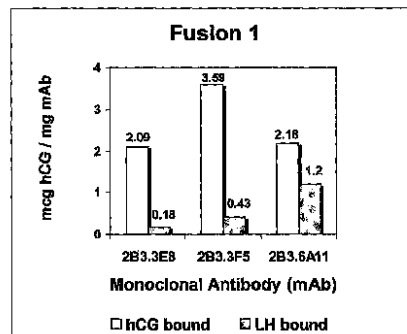
(71) 出願人 508041633
 オンコンノン・リミテッド・ライアビリティ
 ・カンパニー
 ONCONON, LLC.
 アメリカ合衆国20817メリーランド州
 ベセズダ、サウスウィック・ストリート5
 604番
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100116311
 弁理士 元山 忠行
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体組成物、腫瘍性疾患の処置方法、および受胎能の調節方法

(57) 【要約】

性腺刺激ホルモン効果の阻害のための抗体組成物および方法が提供される。それを必要とする哺乳動物の被験体に該抗体組成物を投与することによる、癌を処置するための方法および受胎能を調節する方法が提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：2記載の重鎖可変領域のアミノ酸配列、または配列番号：2と少なくとも90%の相同性のあるアミノ酸配列を含む、ヒト絨毛性ゴナドトロピンと結合する、単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 2】

配列番号：4記載の重鎖可変領域のアミノ酸配列、または配列番号：4と少なくとも90%の相同性のあるアミノ酸配列を含む、ヒト絨毛性ゴナドトロピンと結合する、単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 3】

抗体が、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgM、IgA₁、IgA₂、分泌性IgA、IgDまたはIgE抗体であるところの、請求項2記載の抗体。

【請求項 4】

抗体が、IgG₁ またはIgG₁ アイソタイプであるところの、請求項1記載の抗体。

【請求項 5】

抗体が、IgG₄ またはIgG₄ アイソタイプであるところの、請求項1記載の抗体。

【請求項 6】

抗体が、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgM、IgA₁、IgA₂、分泌性IgA、IgD、またはIgE抗体であるところの、請求項1記載の抗体。

【請求項 7】

抗体が、IgG₁ またはIgG₁ アイソタイプであるところの、請求項2記載の抗体。

【請求項 8】

抗体が、IgG₄ またはIgG₄ アイソタイプであるところの、請求項2記載の抗体。

【請求項 9】

抗体が、ヒト、ヒト以外の霊長類、ラビット、ラットまたはマウス、あるいはそれらの組み合わせであるところの、請求項1記載の抗体。

【請求項 10】

抗体が、ヒト、ヒト以外の霊長類、ラビット、ラットまたはマウス、あるいはそれらの組み合わせであるところの、請求項2記載の抗体。

【請求項 11】

軽鎖可変領域および重鎖可変領域のアミノ酸配列を含み、その重鎖可変領域が、配列番号：2もしくは配列番号：4記載のアミノ酸配列、または配列番号：2もしくは配列番号：4記載のものとして少なくとも90%の相同性のあるアミノ酸配列である、ヒト絨毛性ゴナドトロピンと結合する、単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 12】

抗体が、次の1つまたは複数の特徴：(i)インビトロでBXP C-3脾臓癌細胞の増殖を阻害すること；および(ii)インビトロでMCF-7乳癌細胞またはHeLa細胞の増殖を阻害しないことを有するところの、請求項11記載の抗体。

【請求項 13】

アナライトとして組換えヒト絨毛性ゴナドトロピンを、そしてリガンドとして抗体を用いる表面プラズモン共鳴(SPR)により決定される、約 10^{-8} Mもしくはそれ未満の解離平衡定数(K_D)を有する、請求項11記載の抗体。

【請求項 14】

抗体が、約 10^8 M⁻¹もしくはそれより高い結合能をもって、ヒト絨毛性ゴナドトロピンと結合しうるところの、請求項11記載の抗体。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

真核細胞においてグリコシル化されている、無傷の抗体、無傷の I g G₁ 抗体、無傷の I g G₂ 抗体、無傷の I g G₃ 抗体、無傷の I g G₄ 抗体、無傷の I g M 抗体、無傷の I g A₁ 抗体、無傷の I g A₂ 抗体、無傷の分泌型 I g A 抗体、無傷の I g D 抗体、または無傷の I g E 抗体であるところの、請求項 1 1 記載の抗体。

【請求項 1 6】

抗体断片または一本鎖抗体であるところの、請求項 1 1 記載の抗体。

【請求項 1 7】

(i) リンカーペプチドを介して可変部の軽鎖アミノ酸配列と融合され、免疫グロブリンのヒンジ領域ポリペプチドと融合された、配列番号：2 記載の可変部の重鎖アミノ酸配列、または配列番号：2 と少なくとも 9 0 % の相同性のある可変部の重鎖配列、(i i) 該ヒンジ領域に融合された免疫グロブリン重鎖 C H 2 定常領域、および (i i i) 該 C H 2 定常領域に融合された免疫グロブリン重鎖 C H 3 定常領域を含む、結合ドメイン免疫グロブリン融合蛋白質であるところの、請求項 1 1 記載の抗体。

10

【請求項 1 8】

(i) リンカーペプチドを介して可変部の軽鎖アミノ酸配列と融合され、免疫グロブリンのヒンジ領域ポリペプチドと融合された、配列番号：4 記載の可変部の重鎖アミノ酸配列、または配列番号：4 と少なくとも 9 0 % の相同性のある可変部の重鎖配列、(i i) 該ヒンジ領域に融合された免疫グロブリン重鎖 C H 2 定常領域、および (i i i) 該 C H 2 定常領域に融合された免疫グロブリン重鎖 C H 3 定常領域を含む、結合ドメイン免疫グロブリン融合蛋白質であるところの、請求項 1 1 記載の抗体。

20

【請求項 1 9】

少なくとも 10^{10} M^{-1} の平衡結合定数 (K a) でもって、所定の抗原と結合するところの、請求項 1 1 記載の抗体。

【請求項 2 0】

少なくとも 10^9 M^{-1} の平衡結合定数 (K a) でもって、所定の抗原と結合するところの、請求項 1 1 記載の抗体。

【請求項 2 1】

少なくとも 10^8 M^{-1} の平衡結合定数 (K a) でもって、所定の抗原と結合するところの、請求項 1 1 記載の抗体。

【請求項 2 2】

モノクローナルであるところの、請求項 1 1 記載の抗体。

30

【請求項 2 3】

F (a b ')₂、F a b、F v または F d 断片であるところの、請求項 1 1 記載の抗体。

【請求項 2 4】

抗原特異的であるところの、請求項 1 1 記載の抗体。

【請求項 2 5】

配列番号：2 記載のヒト重鎖可変領域のアミノ酸配列、または配列番号：2 と少なくとも 9 0 % の相同性のあるアミノ酸配列を含む、ヒト絨毛性ゴナドトロピンと結合する、単離されたヒトモノクローナル抗体。

40

【請求項 2 6】

配列番号：4 記載のヒト重鎖可変領域のアミノ酸配列、または配列番号：4 と少なくとも 9 0 % の相同性のあるアミノ酸配列を含む、ヒト絨毛性ゴナドトロピンと結合する、単離されたヒトモノクローナル抗体。

【請求項 2 7】

請求項 1 記載の抗体および医薬上許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項 2 8】

請求項 2 記載の抗体および医薬上許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項 2 9】

請求項 2 5 記載の抗体および医薬上許容される担体を含む、医薬組成物。

50

【請求項 30】

請求項 26 記載の抗体および医薬上許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項 31】

抗体または抗原結合断片が、(i) 2B2.6F5 抗体 (ATCC 受入番号 No.) のヒト絨毛性ゴナドトロピンに対する結合を競合的に阻害し、(ii) 表面プラズモン共鳴により決定され、結合定数 (Ka) として測定された少なくとも 1×10^8 リットル/モルの親和力をもって、インビポでヒト絨毛性ゴナドトロピンの中和エピトープと結合するところの、ヒト定常領域を含む単離された組換え抗 - ヒト絨毛性ゴナドトロピン抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 32】

ヒト定常領域およびヒト可変領域を含むところの、請求項 31 記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 33】

少なくとも 1 つのヒト軽鎖および少なくとも 1 つのヒト重鎖を含むところの、請求項 31 記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 34】

軽鎖が、2B2.6F5 抗体 (ATCC 受入番号 No.) の軽鎖の全抗原結合領域を含むところの、請求項 33 記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 35】

重鎖が、2B2.6F5 抗体 (ATCC 受入番号 No.) の重鎖の全抗原結合領域を含むところの、請求項 33 記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 36】

軽鎖が、2B2.6F5 抗体 (ATCC 受入番号 No.) の軽鎖の全抗原結合領域を含み、そして、重鎖が、2B2.6F5 抗体 (ATCC 受入番号 No.) の重鎖の全抗原結合領域を含むところの、請求項 33 記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 37】

抗体または抗原結合断片が、(i) 2B3.3E8 抗体 (ATCC 受入番号 No.) のヒト絨毛性ゴナドトロピンに対する結合を競合的に阻害し、(ii) 表面プラズモン共鳴により決定され、結合定数 (Ka) として測定された少なくとも 1×10^8 リットル/モルの親和力をもって、インビトロでヒト絨毛性ゴナドトロピンの中和エピトープと結合する、ヒト定常領域を含む、単離された組換え抗 - ヒト絨毛性ゴナドトロピン抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 38】

ヒト定常領域およびヒト可変領域を含むところの、請求項 37 記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 39】

少なくとも 1 つのヒト軽鎖および少なくとも 1 つのヒト重鎖を含む、請求項 37 記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 40】

軽鎖が、2B3.3E8 抗体 (ATCC 受入番号.) の軽鎖の全抗原結合領域を含むところの、請求項 39 記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 41】

重鎖が、2B3.3E8 抗体 (ATCC 受入番号.) の重鎖の全抗原結合領域を含むところの、請求項 39 記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 42】

軽鎖が、2B3.3E8 抗体 (ATCC 受入番号.) の軽鎖の全抗原結合領域を含み、重鎖が、2B3.3E8 抗体 (ATCC 受入番号.) の重鎖の全抗原結合領域を含むところの、請求項 39 記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 43】

10

20

30

40

50

試料中のヒト絨毛性ゴナドトロピンを検出する方法であって、(a) 試料を供すること；(b) (a) の試料を、ヒト絨毛性ゴナドトロピンを含むポリペプチドリガンドのヒト絨毛性ゴナドトロピンに対する結合を可能にする条件下で、該ポリペプチドを特異的に結合するヒトモノクローナル抗体 2 B 2 . 6 F 5 (A T C C 受入番号 .) またはヒトモノクローナル抗体 2 B 3 . 3 E 8 (A T C C 受入番号 .) と接触させること；および(c) 試料中のヒト絨毛性ゴナドトロピンの存在を示す、抗体 2 B 2 . 6 F 5 または抗体 2 B 3 . 3 E 8 の試料中のヒト絨毛性ゴナドトロピンとの結合を検出し、それにより、試料中のヒト絨毛性ゴナドトロピンを検出することを含む、方法。

【請求項 4 4】

請求項 1、2、25 または 26 記載の抗体の重鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列をコードする、単離された核酸。

10

【請求項 4 5】

請求項 4 4 記載の抗体および医薬上許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項 4 6】

請求項 1、2、25 または 26 記載の抗体の免疫グロブリン可変ドメイン配列をコードする、1 つまたは複数の核酸を含有する、組換え細胞。

【請求項 4 7】

抗体の H C 可変ドメインを含むポリペプチドをコードする第一の核酸配列、および請求項 1、2、25 または 26 記載の蛋白質である抗体の L C 可変ドメインを含むポリペプチドをコードする第二の核酸配列を有する、宿主細胞。

20

【請求項 4 8】

ヒト絨毛性ゴナドトロピンの - L 2 ループのアミノ酸 3 8 - 5 7 (配列番号 : 7) と特異的に結合する単離されたヒトモノクローナル抗体、またはその類似体。

【請求項 4 9】

哺乳動物被検体の腫瘍性疾患を処置するための方法であって、哺乳動物被検体に、ヒト絨毛性ゴナドトロピンの - L 2 ループ (配列番号 : 7) または - L 2 ループの類似体と特異的に結合する抗体を含む医薬組成物を、該哺乳動物被検体の腫瘍性疾患を軽減または除去するのに有効な量で投与することを含む、方法。

【請求項 5 0】

抗体が、配列番号 : 2 または配列番号 : 4 記載のアミノ酸配列を含むところの、請求項 4 9 記載の方法。

30

【請求項 5 1】

抗体が、ヒトモノクローナル抗体 2 B 2 . 6 F 5 (A T C C 受入番号 .) であるところの、請求項 5 0 記載の方法。

【請求項 5 2】

抗体が、ヒトモノクローナル抗体 2 B 3 . 3 E 8 (A T C C 受入番号 .) であるところの、請求項 5 0 記載の方法。

【請求項 5 3】

抗体が、h C G の L H / h C G 受容体に対する結合を遮断するところの、請求項 4 9 記載の方法。

40

【請求項 5 4】

抗体が、細胞傷害性物質と連結されているところの、請求項 4 9 記載の方法。

【請求項 5 5】

細胞傷害性物質が、細胞傷害性薬であるところの、請求項 5 4 記載の方法。

【請求項 5 6】

細胞傷害性物質が放射性同位体であるところの、請求項 5 4 記載の方法。

【請求項 5 7】

化学療法剤を含む医薬組成物を哺乳動物被検体に投与することをさらに含む、請求項 4 記載の方法。

【請求項 5 8】

50

腫瘍性疾患が、固形癌、肺癌、乳癌、結腸直腸癌、前立腺癌、胃癌、膵臓癌、頭頸部癌、腎細胞癌、卵巣癌、膀胱癌、黒色腫、子宮癌、子宮平滑筋腫、子宮内膜癌、多嚢胞性卵巣症候群、子宮内膜ポリープ、下垂体癌、腺筋症、腺癌、髄膜腫、骨肉腫、血液悪性腫瘍、白血病、多発性骨髄腫、神経膠腫、グリア芽腫または星状細胞腫であるところの、請求項 49 記載の方法。

【請求項 59】

腫瘍性疾患が、該哺乳動物被検体における腫瘍細胞転移であるところの、請求項 58 記載の方法。

【請求項 60】

腫瘍性疾患を有することが疑われる、または腫瘍性疾患に関する危険性があると疑われる哺乳動物被検体の癌を診断する方法であって、

該被検体の血液または組織から、細胞集団を含む試験試料を得ること、
細胞集団内の細胞におけるヒト絨毛性ゴナドトロピンマーカの有無を検出するために、ヒトモノクローナル抗体 2B2.6F5 (ATCC 受入番号、) またはヒトモノクローナル抗体 2B3.3E8 (ATCC 受入番号、) を供すること

、
細胞を特定し特徴付けるために、ヒト絨毛性ゴナドトロピンマーカにより検出された細胞集団を分析し、その細胞上もしくは内におけるヒト絨毛性ゴナドトロピンマーカの存在が、哺乳動物被検体の腫瘍性疾患または腫瘍性疾患の危険性を示すことを含む、方法

【請求項 61】

抗体が、配列番号：2 または配列番号：4 に記載のアミノ酸配列を含むところの、請求項 60 記載の方法。

【請求項 62】

被検物中の細胞上もしくは内におけるヒト絨毛性ゴナドトロピンマーカの存在が、哺乳動物被検体における転移性癌の存在を示すところの、請求項 60 記載の方法。

【請求項 63】

被検物中の細胞上もしくは内におけるヒト絨毛性ゴナドトロピンマーカの存在が、哺乳動物被検体における早期癌の存在を示すところの、請求項 60 記載の方法。

【請求項 64】

被検物中の細胞上もしくは内にヒト絨毛性ゴナドトロピンマーカが存在しないことが、哺乳動物被検体における疾患のない状態または測定不能な疾患状態にあることを示すところの、請求項 60 記載の方法。

【請求項 65】

被検物中の細胞上もしくは内におけるヒト絨毛性ゴナドトロピンマーカの有無により、癌治療または癌回復中の治療管理を監視するところの、請求項 60 記載の方法。

【請求項 66】

抗体と会合されたイメージング部分をさらに含む、請求項 60 記載の方法。

【請求項 67】

画像化部分が、磁気共鳴分光法、X線分光法、または陽電子断層撮影法 (PET) を通じて画像化され得るところの、請求項 66 記載の方法。

【請求項 68】

会合が、共有結合であるところの、請求項 66 記載の方法。

【請求項 69】

会合が、非共有結合であるところの、請求項 66 記載の方法。

【請求項 70】

腫瘍性疾患が、固形癌、肺癌、乳癌、結腸直腸癌、前立腺癌、胃癌、膵臓癌、頭頸部癌、腎細胞癌、卵巣癌、膀胱癌、黒色腫、子宮癌、子宮平滑筋腫、子宮内膜癌、多嚢胞性卵巣症候群、子宮内膜ポリープ、下垂体癌、腺筋症、腺癌、髄膜腫、骨肉腫、血液悪性腫瘍、白血病、多発性骨髄腫、神経膠腫、グリア芽腫または星状細胞腫であるところの、請求

10

20

30

40

50

項 6 0 記載の方法。

【請求項 7 1】

医薬上許容される担体中の、配列番号：2 または配列番号：4 記載のアミノ酸配列を含み、ヒト絨毛性ゴナドトロピンに特異的に結合する抗体を、哺乳動物被検体のホルモンの不均衡により生じる疾患を軽減または除去するのに有効な量で哺乳動物被検体に投与することを含む、哺乳動物被検体におけるホルモンの不均衡により生じる疾患を処置する方法。

【請求項 7 2】

抗体が、ヒトモノクローナル抗体 2 B 2 . 6 F 5 (A T C C 受入番号 .) またはヒトモノクローナル抗体 2 B 3 . 3 E 8 (A T C C 受入番号 .) であるところの、請求項 7 1 記載の方法。

10

【請求項 7 3】

疾患が、前立腺癌、多嚢胞性卵巣疾患、リウマチ性疾患、敗血症性ショック、子宮内膜症、平滑筋腫、細胞障害性化学療法中の卵巣変性、またはアルツハイマー病であるところの、請求項 7 1 記載の方法。

【請求項 7 4】

医薬上許容される担体中の、配列番号：2 または配列番号：4 記載のアミノ酸配列を含み、ヒト絨毛性ゴナドトロピンに特異的に結合する抗体を、哺乳動物被検体の流産を誘導するのに有効な量で哺乳動物被検体に投与することを含む、哺乳動物被検体に流産を誘導する方法。

20

【請求項 7 5】

抗体が、ヒトモノクローナル抗体 2 B 2 . 6 F 5 (A T C C 受入番号 .) またはヒトモノクローナル抗体 2 B 3 . 3 E 8 (A T C C 受入番号 .) であるところの、請求項 7 4 記載の方法。

【請求項 7 6】

医薬上許容される担体中の、配列番号：2 または配列番号：4 記載のアミノ酸配列を含み、ヒト絨毛性ゴナドトロピンに特異的に結合する抗体を、哺乳動物被検体の受胎能を低下させるのに有効な量で哺乳動物被検体に投与することを含む、哺乳動物被検体の受胎能を低下させる方法。

【請求項 7 7】

抗体が、ヒトモノクローナル抗体 2 B 2 . 6 F 5 (A T C C 受入番号 .) またはヒトモノクローナル抗体 2 B 3 . 3 E 8 (A T C C 受入番号 .) であるところの、請求項 7 6 記載の方法。

30

【請求項 7 8】

哺乳動物被検体における癌の処置のための薬物候補化合物をスクリーニングする方法であって、

癌を有することが疑われる被検体に治療上有効量の薬物候補化合物を投与すること、薬物候補化合物を用いた処置の前後に、該被検体の血液または組織から、腫瘍細胞を含むことが疑われる細胞集団を含む試験試料を得ること、

該試験試料中の細胞におけるヒト絨毛性ゴナドトロピンマーカーの有無を検出するために、ヒトモノクローナル抗体 2 B 2 . 6 F 5 (A T C C 受入番号 .) またはヒトモノクローナル抗体 2 B 3 . 3 E 8 (A T C C 受入番号 .) を供すること、

40

処置前の検体中の腫瘍細胞の数と比較して処置後の検体中の減少した数の腫瘍細胞の存在が、哺乳動物被検体の癌を処置するにあたっての薬物候補化合物の有効性を示すため、薬物候補化合物を用いた処置後と比較される、薬物候補化合物を用いた処置前の試験試料中の腫瘍細胞を特定するためにヒト絨毛性ゴナドトロピンマーカーにより検出される細胞集団を分析することを含む、方法。

【請求項 7 9】

抗体が、配列番号：2 または配列番号：4 記載のアミノ酸配列を含むところの、請求項

50

78記載の方法。

【請求項80】

癌が、転移性癌または早期癌であるところの、請求項78記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本特許出願は、2005年8月8日に出願され、表題「PASSIVE IMMUNITY TO TARGET AND BLOCK RECEPTOR BINDING OF GONADOTROPINS」の米国仮出願番号第60/706,506号(その全内容は出典明示により本明細書の一部とされる)に基づき、またその優先権を主張する。

10

【0002】

(技術分野)

本発明は、性腺刺激ホルモン効果の阻害のための抗体組成物、そしてそれを必要とする哺乳動物被験体に該抗体組成物を投与することによる癌を処置するための方法および受胎能を調節するための方法に関する。

【背景技術】

【0003】

ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)の研究は、3つの要素A)hCGタンパク鎖および炭水化物の構造;B)受胎能および癌におけるhCGの生物学;そして、C)体液性もしくはT細胞媒介性免疫応答のいずれかを産生する、hCGペプチド、鎖または炭水化物に対するものを含む、hCGを標的とする免疫のためのワクチン接種戦略、に関する。

20

【0004】

ヒト絨毛性ゴナドトロピンは、38kDのヘテロ二量体糖蛋白質である。Morganら、J Biol. Chem. 250: 5247, 1975;HearnおよびGomme, J. Mol. Recognit. 13: 223, 2000。hCG構造の重要な特徴は、図1Aで描かれるように、hCGの鎖と鎖の一次構造の図で確かめることができる。Birkenら、Clin Chem 49: 144, 2003。hCGのサブユニット(-hCG、または図1AのhCG)は、卵胞刺激ホルモン(FSH)、黄体形成ホルモン(LH)および甲状腺刺激ホルモン(TSH)を含む糖蛋白ホルモンで共通する。-hCGタンパク鎖は、92個のアミノ酸から成り、52番目と78番目の残基に2個のN結合型オリゴ糖を有する。hCGホルモン特異的な鎖(-hCG、または図1AのhCG)は145個のアミノ酸から成る。糖蛋白ホルモン間のLH鎖の高い相同性と独自性と比較して、-hCGはさらに31個のアミノ酸をそのカルボキシル末端に有する。4 Morganら、J. Biol. Chem. 250: 5247, 1975。このカルボキシル末端ペプチド(CTP)は、9個のプロリン(29モル%)と8個のセリン(26モル%)残基を有し、屈曲した親水性である。-hCGは、13番目と30番目の残基に2個のN結合型オリゴ糖を有し、また121番目、127番目、132番目と138番目の残基に4個のO結合型オリゴ糖を有する。

30

【0005】

hCGヘテロ二量体の三次構造は、サイトカインのシスチンノット成長因子ファミリー(CKGF)の一員のため注目される。Laphornら、Nature 369: 455, 1994;Wuら、Structure 2: 545, 1994。CKGFファミリーは、他のそのような蛋白質の少なくとも40個中、糖蛋白ホルモン、神経成長因子(NGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)やトランスフォーミング成長因子-(TGF-)を含む。HearnおよびGomme, J. Mol. Recognit. 13: 223, 2000。CKGFサイトカインは、2つのサブユニットの強力な特異的非共有結合の二量体形成により特徴付けられる。各々のサブユニットは、3個のシスチンジスルフィド結合を含み、その内の2個のジスルフィドが3つ目のジスルフィド結合を通り抜けて環を形成する、顕著な保存された構造(ノット(knot))を特徴としている。二次構造は、主として鎖である。各サブユニットの三次構造は、非常に伸びた状態であり、高い表面:容積比を有しており、明確な疎水性コア領域は存在しない。hCGの四次構造は

40

50

、その長軸に沿って、それらの表面領域の約25%が関与するヘッド-テイル会合を有する。二量体形成は、 β -hCGのシスチンノットから伸びる21アミノ酸ループと、 β -hCG付近のループがジスルフィド結合された「シートベルト」を形成し、それにより安定化される。 β -hCGは、44番目と45番目に、または47番目と48番目の残基の間に蛋白質加水分解によりニックが入っている場合がある(図1AのhCG₄₄₋₄₅)。ニックは、hCGの失活をもたらし、サブユニットの解離を促進する。Coleら、*J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76: 704, 1993。尿代謝産物である β -hCGのコア断片(図1AのhCG₄₄₋₄₅)は、未知の機能を有する。Normanら、*J. Endocrinol.* 164: 299, 2000; Birkenら、*Arch. Med. Res.* 32: 635, 2001。 β -ヘテロ二量体に加えて、 β -hCGは、単量体とホモ二量体型の両方が見出された。Butlerら、*J. Mol. Endocrinol.* 22: 185, 1999。

【0006】

8個のオリゴ糖は、hCGの分子量の約30%を占める。これは、近縁の相同体(LHは、3個のN連結オリゴ糖を、その鎖に2個、鎖に1個有するのみである)で見られる炭水化物よりも多い。各オリゴ糖は、最大2価の負に帯電した末端の糖を有する。従って、hCGは、顕著なことに最終的に負に帯電している。hCGと会合するオリゴ糖は非常に不均一であり、ホルモンの大きさや帯電の不均一性の理由となる。

【0007】

β -ヘテロ二量体hCGは、LH/hCG受容体に結合し、活性化する。Ascoliら、*Endocr. Rev.* 23: 141, 2002。対照的に、 β -hCG、 β -hCG、ニック入りの β -hCG、または β -hCGコア断片はいずれも、組換えヒトLH-hCG受容体に結合しない。Hoら、*Early Pregnancy* 3: 204, 1997。 β -hCGのこの領域に特異的な抗体がLH/hCG受容体のシグナル伝達を干渉しないので、そのカルボキシル末端ペプチドは受容体の結合またはシグナル伝達にほとんど重要でないようである。Iversonら、*Curr. Opin. Mol. Ther.* 5: 156, 2003; Dirnhoferら、*FAEB J.* 7: 1381, 1993。化学的に脱グリコシル化したhCGは、ラットLH/hCG受容体と結合するが、活性化しない。Chenら、*J. Biol. Chem.* 257: 14446, 1982。個々のN-連結炭水化物部分は、hCGの機能に影響を及ぼさないようである。HearnおよびGomme、*J. Mol. Recognit.* 13: 223, 2000。

【0008】

ヒト絨毛性ゴナドトロピンは、生殖において実際に示された役割を有する。AscheimおよびZondek、*Klin. Wochenschr* 248, 1927。hCGは、生殖に絶対的に必要とされ、多くの組織におけるLH/hCG受容体の発現を考慮すると、妊娠に極めて多面的な役割を有するようである。Rao、*Semin. Reprod. Med.* 19: 7, 2001; Filicoriら、*Fertil. Steril* 84: 275, 2005。提案されているこれらの受容体が行う役割の幾つかには、細胞栄養芽層の浸潤の容易化、血管形成および免疫抑制(Islamiら、*Semin. Reprod. Med.* 19: 49, 2001; Lichtら、*Semin. Reprod. Med.* 19: 37, 2001)、ならびにアポトーシス抑制が含まれる。Kurodaら、*Int. J. Cancer* 91: 309, 2001。加えて、合胞体栄養細胞表面にあるhCGの広範囲のシアリル化により付与される正味の負電荷は、それ自身によっても免疫抑制性となり得る。Vanら、*Int. J. Cancer* 38: 915, 1986。

【0009】

妊娠していない状態では、血清hCGは下垂体前葉からの微量の脈動的分泌を介して低濃度で存在し得る。Birkenら、*Endocrinology* 137: 1402, 1996。それにもかかわらず、hCGはまた、多くの非生殖組織の癌細胞により産生される。Cosgroveら、*Biochim. Biophys. Acta.* 1007: 44, 1989; Stenmanら、*Clin. Biochem.* 37: 549, 2004。ヒト生殖と悪性形質転換との類似性に鑑み、かくして、hCGは悪性形質転換のマーカーとして提案された。Acevedo、*J. Exp. Ther. Oncol* 2: 133, 2002; MurrayおよびLessey、*Semin. Reprod. Endocrinol* 17: 275, 1999。これと一致して、 β -ヘテロ二量体hCGは、LH/hCG受容体を発現する卵巣癌細胞においてシスプラチン誘導性のアポトーシスを抑制することが見られた。Kurodaら、*Int. J. Cancer* 76: 571, 1998。しかしながら、hCGは悪性腫瘍に感受性でも特異的でもない。

【 0 0 1 0 】

癌における hCG の推定の役割に関して、2つの驚くべき観察がなされた。第一に、膜に結合した hCG が、多種多様な培養癌細胞の表面に見られた。Acevedoら、Cancer 69: 1829, 1992。hCG が膜貫通領域を持たない分泌型蛋白質であるため、このことは注目すべきことである。第二に、血清 - hCG は、膀胱癌のより侵略的な悪性の提示と関係していることは注目される。Ilesら、Br. J. Urol. 64: 241, 1989。また、転移表現型は、動物モデルにおける - hCG 発現との一致が見い出された。AcevedoおよびHartsock, Cancer 78: 2388, 1996。これらの知見は、- hCG が LH / hCG 受容体と結合しないので、不確かな意味を示す。次に、hCG - は、結腸直腸、胃、口、膵臓、卵巣および腎臓細胞を含む6つの異なる上皮癌の独立した陰性の予後指標であることが多変量解析によって分かった。Louhimoら、Int. J. Cancer 101: 545, 2002; Louhimoら、Int. J. Cancer 111: 929, 2004; Hedstromら、Int. J. Cancer 84: 525, 1999; Louhimoら、Oncology 66: 126, 2004; Vartianinenら、Int. J. Cancer 95: 313, 2001; Hotakainenら、Br. J. Cancer 86: 185。不思議なことに、免疫組織化学では - hCG の組織レベルは結腸直腸癌の陰性の予後徴候でもあったが、血清の - hCG だけは腎細胞癌で有意に予後徴候を示した。Lundinら、Int. J. Cancer 95: 18, 2001; Hotakainenら、Int. J. Cancer 104: 631。このように、可溶性 - hCG は、現在では癌の進行に重要な役割を果たすと推定することができる。

10

【 0 0 1 1 】

- hCG は、単量体もしくはホモ二量体のいずれかがインビトロで、膀胱癌細胞のアポトーシスを抑制することが見出された。Butlerら、Br. J. Cancer 82: 1553, 2000; ButlerおよびIles, Tumour Biol. 25: 18, 2004。著者らは、- hCG が TGF- β 受容体を活性化することなく結合することで、TGF- β に媒介されるアポトーシスを抑制する機序を提案する。同様に、- hCG が他のCKGFサイトカイン、PDGFの活性を抑制し得ることも想像できる。Pietrasら、Cancer Res. 62: 5476, 2002。前立腺癌細胞における - hCG の改変発現により、下方制御のE-カドヘリンと上方制御の侵襲性が見られた。WuおよびWalker, Cancer 106: 68, 2006。後の実験において、馴化培地で同じ効果が確認され、このことは、培地上清中の可溶性 - hCG がこの効果を生じさせたことを示す。この例でもその受容体は不明であったが、少なくとも40個のCKGFサイトカインファミリーのメンバーは存在するため(HearnおよびGomme, J. Mol. Recognit. 13: 223, 2000)、いまだ未確認のさらなる受容体(類)の関与はありそうである。hCG がカポジ肉腫を阻害するという知見は、より幅広い公衆衛生上重要な様々な上皮癌におけるhCGの役割と相容れないとは考えられない。Butler およびIles, Clin Cancer Res. 9: 4666, 2003。

20

30

【 0 0 1 2 】

受胎能を制御するためにhCGを標的とするワクチン接種が、数十年間求められてきた。Nazら、Hum. Reprod. 20: 3271, 2005。最初、これらのワクチンは、- hCGのCTPに、または、全長 - hCGに活性のある特異的な体液性免疫を起こすことを試みた。Leeら、Mol. Immunol. 17: 749, 1980; Talwarら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 8532, 1994。そのようなワクチンの効力は、原理的には実証された。Stevensら、Fertil. Steril. 36: 98, 1981; Talwarら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 8532, 1994。これらのアプローチの確立には、様々な - hCG成分または融合蛋白質としての組換え抗原発現が用いられた。Rockら、Vaccine 14: 1560, 1996; RoutおよびVrati, Vaccine 15: 1503, 1997; Xuら、Sheng Wu Gong. Cheng. Xue. Bao. 20: 49, 2004; Yankaiら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 345: 1365, 2006; Geisslerら、Lab Invest. 76: 859, 1997。

40

【 0 0 1 3 】

同様のアプローチが、癌治療のために続行された。TriozziおよびStevens, Oncol Res. 6: 7, 1999; Moultonら、Clin. Cancer Res. 8: 2044, 2002。さらなる改良には、受動投与される抗体(Butlerら、Oncol. Res. 14: 93, 2003)、CTPに特異的なモノクロー

50

ナル抗体 (KalantarovおよびAcevedo, Cancer 83: 783, 1998)、一般的な免疫付与 (Geisslerら、Lab Invest. 76: 859, 1997) および β -hCGに対して活性のあるT細胞媒介性免疫を起させるための標的化融合蛋白質が含まれる。Heら、Clin. Cancer Res. 10: 1920, 2004。さらに別には、モノクローナル抗体を介し、高グリコシル化 β -hCG (H-hCG)のCTPに提示されたオリゴ糖アイソフォームを含むO-結合型コア2糖を標的することを試みる。Birkenら、Arch. Med. Res. 32: 635, 2001; Birkenら、Endocrine 10: 137, 1999; Birken, Tumour Biol 26: 131, 2005; Coleら、Gynecol. Oncol. 102: 145, 2006; 米国特許第6,764,680号明細書; 米国特許出願第2005/0260196号。

【0014】

上記アプローチのほとんどは、能動免疫方策を用いる。このように、これらの方法は抗体またはT細胞媒介免疫のいずれかが出現することを要求し、一部の受容者は十分な免疫応答を起こすのに失敗する。 β -hCGまたはH-hCGの免疫標的化に対する上記アプローチはいずれも、明確にはLH/hCGまたは他のいずれかの受容体に対する β -hCGの結合を阻害するものではない。特に、CTPまたはH-hCGのいずれかを標的とする製剤は、受容体結合を阻害しない。表面結合型 β -hCGを有する癌細胞の標的化を可能にする実験法が開発されたが、 β -hCGの予後的意義に関するデータの意義は、有害効果を媒介する受容体に対する血清 β -hCG結合による阻害が、hCGの免疫標的化による癌治療にきわめて重要であると示す。さらにまた、上記アプローチのいずれも、癌化学療法で相乗作用を示さなかった。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

このように、当分野には β -hCGを分泌する癌のより有効な処置法を作り上げる必要性がある。この問題を扱うため、次の2つの基準を満たす方法で β -hCGを標的とする手法が必要とされる。第一に、作り出される物質は、受動投与に素早く追従して血清 β -hCGを標的とすることが可能でなければならない。実際には、これはモノクローナル抗体または免疫特異性を有する類似のメディエータの使用によって達成することができた。第二に、方法は、癌進行と関係する悪影響を媒介する β -hCGのその受容体(群)に対する結合を阻害する処置を作り出さなければならない。具体的には、このことは、立体構造が明らかにされ、そして表面の接近可能なエピトープに特異的な免疫の創出を意味する。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明は、一般に、性腺刺激ホルモン効果の阻害のための抗体組成物および方法に関し、その必要のある哺乳動物被験体に該抗体組成物を投与することによって、癌を処置する方法および受胎能を調整する方法を含む。さらに、本発明は、ヒト絨毛性ゴナドトロピン鎖とその同起源の受容体のいずれかとの結合の阻害し、その結果としてのヒトの癌増殖における抑制効果に関する。

【0017】

哺乳動物被験体の腫瘍性疾患を軽減もしくは除去するのに有効な量で、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)のL2ループに特異的に結合する抗体を含む医薬組成物を、哺乳動物被験体に投与することを含む、哺乳動物被験体の腫瘍性疾患を処置する方法が提供される。本方法では、抗体は、配列番号: 2または配列番号: 4に記載のアミノ酸配列を含み得る。抗体は、ヒトモノクローナル抗体2B2.6F5(ATCC受入番号、

)またはヒトモノクローナル抗体2B3.3E8(ATCC受入番号、

)である。配列番号: 2または配列番号: 4に記載のアミノ酸配列を含む抗体組成物が提供される。ヒトモノクローナル抗体2B2.6F5(ATCC受入番号、

)またはヒトモノクローナル抗体2B3.3E8(ATCC受入番号、)を含む抗体組成物が提供される。さらなる態様において、抗体は、細胞障害性物質、例えば、

10

20

30

40

50

細胞障害薬もしくは放射性同位体と連結される。さらなる態様において、腫瘍性疾患を処置する方法は、該モノクローナル抗体と組み合わせて化学療法剤を含む医薬組成物を哺乳動物被検体に投与することをさらに含む。

【0018】

哺乳動物被検体において中絶を誘導するのに有効な量で、ヒト絨毛性ゴナドトロピンに特異的に結合するヒトモノクローナル抗体 2B2・6F5 (ATCC 受入番号、

) またはヒトモノクローナル抗体 2B3・3E8 (ATCC 受入番号、) を含む医薬組成物を哺乳動物被検体に投与することを、哺乳動物被検体において中絶を誘導する方法が提供される。哺乳動物被検体の受胎能を低下させるのに有効な量で、ヒト絨毛性ゴナドトロピンに特異的に結合するヒトモノクローナル抗体 2B2・6F5 (ATCC 受入番号、) またはヒトモノクローナル抗体 2B3・3E8 (ATCC 受入番号、) を含む医薬組成物を哺乳動物被検体に投与することを、哺乳動物被検体の受胎能を低下させる方法が提供される。該抗体は、さらに配列番号：2 または配列番号：4 に記載のアミノ酸配列を含み得る。

10

【0019】

配列番号：2 に記載の重鎖可変領域のアミノ酸配列または配列番号：2 と少なくとも 90% の同一性のあるアミノ酸配列を含む、ヒト絨毛性ゴナドトロピンと結合する、単離されたモノクローナル抗体が提供される。

【0020】

配列番号：4 に記載の重鎖可変領域のアミノ酸配列または配列番号：4 と少なくとも 90% の同一性のあるアミノ酸配列を含む、ヒト絨毛性ゴナドトロピンと結合する、単離されたモノクローナル抗体が提供される。

20

【0021】

その軽鎖可変領域と、配列番号：2 もしくは配列番号：4 に記載のものであるかまたは配列番号：2 もしくは配列番号：4 と少なくとも 90% の同一性のあるアミノ酸配列である重鎖可変領域を含む、ヒト絨毛性ゴナドトロピンと結合する、単離されたモノクローナル抗体が提供される。

【0022】

1つの態様において、単離されたモノクローナル抗体は、次の特徴：(i) インビトロで BXP C-3 脾臓癌細胞の増殖を阻害すること；および (ii) インビトロで MCF-7 乳癌細胞または HeLa 細胞の増殖を阻害しないこと、の 1つまたはそれ以上のを有する。さらなる態様において、抗体は、アナライトとしてヒト絨毛性ゴナドトロピンそしてリガンドとして抗体を用いた表面共鳴プラズモン (SPR) により決定された、約 10^{-8} M またはそれ以下の解離平衡定数 (K_D) を有する。抗体は、約 10^8 M⁻¹ またはそれ以上の結合力をもってヒト絨毛性ゴナドトロピンと結合することができる。単離されたモノクローナル抗体は、抗体断片であっても一本鎖抗体であってもよい。

30

【0023】

単離されたモノクローナル抗体は、(i) リンカーペプチドを介して可変軽鎖アミノ酸配列に融合され、免疫グロブリンのヒンジ領域ポリペプチドと融合された、配列番号：2 に記載の可変重鎖アミノ酸配列または配列番号：2 と少なくとも 90% の同一性のある可変重鎖配列、(ii) ヒンジ領域と融合された免疫グロブリン重鎖 CH2 定常領域、および (iii) CH2 定常領域と融合された免疫グロブリン重鎖 CH3 定常領域を含む、結合ドメイン免疫グロブリン蛋白質であってよい。単離されたモノクローナル抗体は、(i) リンカーペプチドを介して可変軽鎖アミノ酸配列に融合され、免疫グロブリンのヒンジ領域ポリペプチドと融合された、配列番号：4 に記載の可変重鎖アミノ酸配列または配列番号：4 と少なくとも 90% の同一性のある可変重鎖配列、(ii) ヒンジ領域と融合された免疫グロブリン重鎖 CH2 定常領域、および (iii) CH2 定常領域と融合された免疫グロブリン重鎖 CH3 定常領域を含む、結合ドメイン免疫グロブリン蛋白質であってよい。単離されたモノクローナル抗体は、少なくとも 10^{10} M⁻¹ の平衡結合定数 (K_a) をもって所定の抗原と結合できる。単離されたモノクローナル抗体は、少なくとも 1

40

50

0.9 M^{-1} の平衡結合定数 (K_a) でもって所定の抗原と結合できる。抗体は少なくとも 10^8 M^{-1} の平衡結合定数 (K_a) でもって所定の抗原と結合できる。

【0024】

配列番号：2に記載のヒト重鎖可変領域のアミノ酸配列または配列番号：2と少なくとも90%の相同性のあるアミノ酸配列を含み、ヒト絨毛性ゴナドトロピンと結合する、単離されたヒトモノクローナル抗体が提供される。配列番号：4に記載のヒト重鎖可変領域のアミノ酸配列または配列番号：4と少なくとも90%の相同性のあるアミノ酸配列を含み、ヒト絨毛性ゴナドトロピンと結合する、単離されたヒトモノクローナル抗体が提供される。該抗体および医薬上許容される担体を含む医薬組成物が提供される。ヒト定常領域を含む単離された組換え抗-ヒト絨毛性ゴナドトロピン抗体またはその抗原結合断片であって、(i)ヒト絨毛性ゴナドトロピンに対する2B2.6F5抗体(ATCC受入番号)の結合を競合的に阻害し、そして、(ii)表面共鳴プラズモンにより決定され、結合定数(K_a)として測定された、少なくとも 1×10^8 リットル/モルの親和力でもってインビボでヒト絨毛性ゴナドトロピンの中和エピトープと結合する、抗体または抗原結合断片が提供される。ヒト定常領域を含む単離された組換え抗-ヒト絨毛性ゴナドトロピン抗体またはその抗原結合断片であって、(i)ヒト絨毛性ゴナドトロピンに対する2B3.3E8抗体(ATCC受入番号)の結合を競合的に阻害し、そして、(ii)表面共鳴プラズモンにより決定され、結合定数(K_a)として測定された、少なくとも 1×10^8 リットル/モルの親和力でもってインビボでヒト絨毛性ゴナドトロピンの中和エピトープと結合する、抗体または抗原結合断片が提供される。

10

20

【0025】

試料中のヒト絨毛性ゴナドトロピンを検出する方法であって、(a)試料を供すること；(b)(a)の試料を、ヒト絨毛性ゴナドトロピンを含むポリペプチドリガンドのヒト絨毛性ゴナドトロピンに対する結合を可能にする条件下で、該ポリペプチドを特異的に結合するヒトモノクローナル抗体2B2.6F5(ATCC受入番号)またはヒトモノクローナル抗体2B3.3E8(ATCC受入番号)と接触させること；および(c)試料中のヒト絨毛性ゴナドトロピンの存在を示す、抗体2B2.6F5または抗体2B3.3E8の試料中のヒト絨毛性ゴナドトロピンとの結合を検出し、それにより、試料中のヒト絨毛性ゴナドトロピンを検出すること、を含む方法が提供される。

30

【0026】

ヒト絨毛性ゴナドトロピン-L2ループのアミノ酸38-57(配列番号：7)またはその類似物と特異的に結合する、単離されたヒトモノクローナル抗体が提供される。1つの態様において、抗体は、hCGのLH/hCG受容体に対する結合を阻害する。

【0027】

腫瘍性疾患を有することが疑われる、または腫瘍性疾患に関する危険性のあることが疑われる哺乳動物被検体の癌を診断する方法であって、該被検体の血液または組織から細胞集団を含む試験試料を得ること、細胞集団内の細胞におけるヒト絨毛性ゴナドトロピンマーカーの有無を検出するために、ヒトモノクローナル抗体2B2.6F5(ATCC受入番号)またはヒトモノクローナル抗体2B3.3E8(ATCC受入番号)を供すること、および、細胞上もしくは内におけるヒト絨毛性ゴナドトロピンマーカーの存在は、哺乳動物被検体の腫瘍性疾患または腫瘍性疾患の危険性を示すため、その細胞を特定し特徴付けるために、ヒト絨毛性ゴナドトロピンマーカーにより検出された細胞集団を分析することを含む、方法が提供される。

40

【0028】

哺乳動物被検体の癌の処置のための薬物候補化合物をスクリーニングする方法であって、癌を有することが疑われる被検体に治療上有効量の薬物候補化合物を投与すること、薬物候補化合物を用いた処置の前後に、該被検体の血液または組織から、腫瘍細胞を含むことが疑われる細胞集団を含む試験試料を得ること、該試験試料中の細胞においてヒト絨毛性ゴナドトロピンマーカーの有無を検出するため、ヒトモノクローナル抗体2B2.6F

50

5 (ATCC 受入番号 .) またはヒトモノクローナル抗体 2 B 3 . 3 E 8 (ATCC 受入番号 .) を供すること、 処置前の検体中の腫瘍細胞の数と比較して処置後の検体中の減少した数の腫瘍細胞の存在が、哺乳動物被検体の癌を処置するにあたっての薬物候補化合物の有効性を示すため、薬物候補化合物を用いた処置後と比較される、薬物候補化合物を用いた処置前の試験試料中の腫瘍細胞を特定するためにヒト絨毛性ゴナドトロピンマーカーにより検出される細胞集団を分析すること含む、方法が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0029】

本発明は、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) を標的とする、または hCG の基質成分を標的とする抗体を含むワクチンの分野に関する。本発明は、性腺刺激ホルモン効果抑制のための抗体組成物および方法に関し、癌を処置するための方法およびその必要のある哺乳動物被検体に該抗体組成物を投与することにより受胎能を調整する方法が含まれる。本発明は、ヒト絨毛性ゴナドトロピン 鎖のその同起源受容体のいずれかに対する結合の阻害、そしてその結果としてのヒト癌増殖の抑制効果に関する。結合阻害は、本発明の抗体組成物を用いて行うことができる。

10

【0030】

本発明の抗体組成物は、癌治療のより効果的な方法および受胎能を調整する方法を提供するため、細胞が分泌する - hCG を標的とする。抗体は、次の2つの基準を満たす方法で - hCG を標的とし得る。第一に、抗体組成物は、受動投与に素早く追従して血清 - hCG を標的とできるべきである。実際には、これはモノクローナル抗体または免疫特異性を有する類似のメディエータの使用によって達成できた。第二に、方法は、癌進行と関係する悪影響を媒介する - hCG のその受容体 (群) に対する結合を阻害する治療的処置を作り出さなければならない。具体的には、このことは、立体構造が明らかにされ、そして表面の接近可能なエピトープに特異的な免疫の創出を意味する。

20

【0031】

そのような方法は、48番目から53番目の表面の接近可能なアミノ酸を含む - hCG L2 ロンググループに対する免疫特異性の生成により達成され得る。 - hCG の38番目~57番目の環状ペプチドは、ラット卵巣の膜受容体に対する hCG の結合と、ライディッヒ細胞によるテストステロン産生を阻害した。Keutmannら、Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 84: 2038-2042, 1987。しかしながら、結合阻害の確認は、別個の2つの系で再現できなかった。Salesseら、Mol. Cell Endocrinol. 68:113-119, 1990; Jagtapら、J Endocrinol. 172: 311-320, 2002。この環状ペプチドによって産生される構造エピトープに対して生じるポリクローナル抗血清は、インビボ・アッセイでホルモンを中和することが可能であり、これは、エピトープが受容体の結合部位の近くにあることを示す。一方、この知見は、結合された hCG のより迅速な除去によっても理解された。最後に、L2 ロンググループは、44番目の残基と45番目の残基、並びに47番目の残基と48番目の残基の間で切断されることが知られている。そのような開裂は抗体の結合を変化させ、提案するアプローチを妨げるかもしれない。要約すると、 - hCG によって受容体結合を阻害することは、癌治療と受胎能調節に有用であろう。本発明は、 - hCG による LH/hCG 受容体結合を阻害することが実証された - hCG L2 ロンググループに対する免疫特異性のある抗体組成物を提供する。

30

40

【0032】

図1Bは、HCGとHCG 鎖の蛋白質構造のL2 ・ロンググループに相当する hCG、LHとFSHの 鎖のアミノ酸配列を示す。L2 ・ロンググループは、ヘアピン・ターンで連結されるアミノ酸の2本の鎖から成る - hCG タンパク鎖の既知の三次元構造の領域を記載する。「L2」は、HCG 蛋白質配列の鎖間の3個のヘアピン・ターンの第2番目のものであることを示す。図の中の数字2は、L2 ・ロンググループ中のアミノ酸番号38番目から57番目の - hCG タンパク鎖のアミノ酸番号付けを示す。数字4は、特異的に特定のゴナドトロピン 鎖、例えば hCG のL2 ロンググループを

50

標的とするモノクローナル抗体または関連する蛋白質の選択を可能にする免疫原を含むアミノ酸を示す。数字6は、hCG蛋白質結晶構造のL2 ロングループにおいて表面の接近可能なアミノ酸を示す。数字8は、HCG対LHの特異的な標的を可能にするHCGとLHとの間の非保存的アミノ酸の差異(51番目がA P)を示す。

【0033】

図2は、ヘテロ二量体ゴナドトロピンおよびHCG 鎖の、それぞれの受容体に対する結合の概要図を示す。数字10は、ヘテロ二量体ゴナドトロピン、例えばHCG、LHまたはFSHを示す。数字12は、LH-HCG、FSHおよびTSH受容体を含むゴナドトロピン受容体を示す。数字20は、単量体、ホモ二量体または他の多重結合型を含む、会合する共通の鎖糖蛋白ホルモン鎖を含まない型のhCG 鎖を示す。数字22は、LH-HCG、FSHとTSH受容体とは異なるHCG が結合するそれぞれの受容体(群)を表す。数字30は、ゴナドトロピン 鎖のL2 ヘアピンループを示す。これは、本明細書中に記載の本発明により標的とされるゴナドトロピンの蛋白質構造の特異的な領域である。

10

【0034】

図3は、ゴナドトロピンのL2 ・ロングループに対する免疫特異性を誘導するための本明細書中に記載の方法を示す。数字40は、ゴナドトロピン 鎖の - hCG L2 ロングループのアミノ酸配列(38-57)を表す。この配列は、分子内シスチン・ジスルフィド結合を形成するために導入され得る2個のシステイン部分により結合され、ペプチドの環化を引き起こす。38-57のシスチン・ジスルフィド結合は天然のゴナドトロピン蛋白質構造では形成されないが、38-57の配列の分子内ジスルフィド結合の形成は、天然のL2 ロングループに近い三次元立体配座を誘導する。そのような環状ペプチド(群)は、免疫特異性を与えるモノクローナル抗体または関連蛋白質を生成するために用いられる動物(群)またはインビボ実験系(群)における抗ペプチド免疫応答を促進するために、ジフテリアトキソイドのような担体蛋白質と共有結合により連結されてもよい。かくして、38-57のジスルフィド結合の形成は、ゴナドトロピンL2 ロングループに特異的なモノクローナル抗体または関連蛋白質の選択を可能にする。数字42は、HCG 鎖のL2 ロングループに対する免疫特異性を与えるモノクローナル抗体を表し、数字40に対する応答で生成される。数字44は、エフェクター機能(類)に影響する共有結合で連結されたいずれかの小分子または巨大分子を表す。そのようなエフェクター機能は、ゴナドトロピンL2 ロングループを標的とする免疫特異性の結果(42部分)をモディファイする。

20

30

【0035】

図4は、ヘテロ二量体ゴナドトロピン(類)(10)またはHCG 鎖(20)による受容体(12、22)に対する結合およびそれに伴ういずれかの細胞内シグナル伝達事象を妨げるにあたって、L2 ロングループ(30)に対する免疫特異性を有するモノクローナル抗体(42)の作用を概略的に示す。このように、本発明は、それがヘテロ二量体hCG、単量体 - hCG、またはホモ二量体 - hCGの形態であるかどうかに関係なく、 - hCG蛋白質の受容体結合を阻害する。別の実施形態は、L2 ロングループ(30)に対する免疫特異性を提供する、該モノクローナル抗体の断片(42)および/または該蛋白質の組換え型に基づいてもよい。さらなる他の実施形態は、元のモノクローナル抗体の定常領域と異なる免疫エフェクター機能(44)を作り出すことによって誘導されてもよい。

40

【0036】

図5は、ゴナドトロピンL2 ロングループに対する特異性を提供するモノクローナル抗体または断片に固有の機能に、別の、異なるおよび/または付加的な潜在的免疫エフェクター機能(群)(44)を示す。

【0037】

図1~5中の参照番号は、HCG 鎖のアミノ酸番号付け(2); L2 ロングループに対する免疫特異性を誘導する免疫原(4); L2 ロングループのHCGの表面

50

の接近可能なアミノ酸(6); LH対HCG鎖免疫特異性の基礎(8); ヘテロ二量体ゴナドトロピン(10); ヘテロ二量体ゴナドトロピン受容体(12); hCG鎖(20); HCG鎖が結合する受容体(群)(22); ゴナドトロピン鎖のL2ヘアピループ(30); HCG鎖の38-57ループペプチド(40); ゴナドトロピン鎖に特異的な液性免疫を与える蛋白質(42); 免疫エフェクター機能を与える蛋白質(44)を示す。

【0038】

本発明は、hCG蛋白質のL2ロンググループに結合する抗体組成物を提供する。その抗体組成物は、哺乳動物被検体における腫瘍性疾患を処置する方法、中絶を誘発する方法、および哺乳動物被検体において受胎能を低下させる方法に用いることができる。この抗体組成物は、配列番号: 2または配列番号: 4に記載のアミノ酸配列を含み得る。さらに、抗体は、ヒトモノクローナル抗体2B2.6F5(ATCC受入番号:)またはヒトモノクローナル抗体2B3.3E8(ATCC受入番号:)をさらに含んでいてもよい。

10

【0039】

更なる態様において、卵胞刺激ホルモン(FSH)、黄体形成ホルモン(LH)または甲状腺刺激ホルモン(TSH)に対するモノクローナル抗体を投与することを含み、疾病が哺乳動物被検体において軽減もしくは排除される、哺乳動物被検体において疾病を処置する方法が提供される。詳細な態様において、モノクローナル抗体は、FSH、LHまたはTSHのサブユニット・ポリペプチドのL2ロンググループに対するものである。

20

【0040】

本発明が、特定の方法、試薬、化合物、組成物または生体系に限られていないこと、もちろんそれらも変化してもよいことは理解されるべきである。本明細書中で用いられる用語が、特定の実施形態に記載するためだけのものであって、限定することを目的としないうちにも理解されるべきである。本明細書および添付の請求の範囲で用いられるように、その内容が特に明確に示されない限り、単数形「a」、「an」および「the」、は複数形を含む。したがって、例えば、「細胞(a cell)」に対する言及は、2つまたはそれ以上の細胞などの組み合わせを含む。

【0041】

測定可能な値、例えば、量、時間的な期間などに言及する場合、本明細書中で用いられる用語「約」、は、所定の値から±20%または±10%、より望ましくは±5%、いっそうより望ましくは±1%、さらにより望ましくは±0.1%の変動を含むものであり、そのような変動は開示された方法を実施するために適当なものである。

30

【0042】

特に定義されない限り、本明細書中で用いられるすべての専門用語および科学用語は、本発明に関する当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書中で記載の方法および材料と類似するまたは同等の方法および材料は、本発明を試験するための実地に用いることができるが、好ましい材料および方法を本明細書中で記載する。本発明を記載し、特許請求するにあたって、以下の用語を用いる。

【0043】

「患者」、「被検体」または「哺乳動物」は、交換可能に用いられ、ヒト患者およびヒト以外の霊長類ならびに実験動物、例えばウサギ、ラットやマウスおよび他の動物を示す。動物は、例えば哺乳類と非哺乳類の脊椎動物、例えばヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類および爬虫類を含む。

40

【0044】

「処置すること」または「処置」は、疾病の症状、合併症または生化学徴候(例えば癌、転移癌、転移性上皮癌、結腸直腸癌、胃癌、口腔癌、膀胱癌、卵巣癌または腎細胞癌)の発症を予防するか遅延させるため、症状を軽減させるか、または疾病、病状または障害のさなる進行を抑制もしくは阻止するため、本発明の抗体組成物、化合物または作用剤の投与を含む。処置は、症状の予防であるか(疾病の発症を予防するか遅延させる、あるいは

50

その臨床症状もしくは無症状の徴候を予防すること)、疾病の徴候後の治療上の抑制または緩和でもよい。

【0045】

「癌」または「悪性腫瘍」は、同意義語として用いられ、細胞の抑制されていない異常な増殖、局所的にまたは血流やリンパ系を通じて体の他の部分に伝播する病的細胞の能力(すなわち転移)、並びに多くの特性構造的および/または分子的特徴のいずれかにより特徴づけられる、多くの疾病のいずれかを示す。「癌性」または「悪性細胞」は、特異な構造上の特性を有し、分化能が欠如しており、浸潤および転移できる細胞として理解されている。癌の例には、乳癌、肺癌、脳腫瘍、骨肉腫、肝癌、腎臓癌、大腸癌および前立腺癌がある(DeVitaら編、Cancer Principles and Practice of Oncology, 第6版、Lippincott WilliamsおよびWilkins, Philadelphia, PA, 2001; 全ての目的についてその全部は出典明示により本明細書の一部とされる)。

10

【0046】

「癌関連」は、核酸とその発現もしくはその欠如、または蛋白質とそのレベルもしくは活性、もしくはその欠如の、被検体細胞での悪性腫瘍の発症との関係を示す。例えば、癌は、正常な健康な細胞では発現されないか、または低レベルで発現されている特定の遺伝子の発現と関連する。反対に、癌関連遺伝子は、悪性細胞(または形質転換を受けている細胞)で発現されない遺伝子であるか、または正常な健康な細胞で発現されるより、悪性細胞では低レベルで発現される遺伝子であってもよい。

20

【0047】

癌の内容において、用語「形質転換」は、正常細胞が悪性となる際に正常細胞が受ける変化を示す。真核細胞において用語「形質転換」は、細胞培養で正常細胞の悪性細胞への転換を示すために用いてもよい。

【0048】

「増殖性細胞」は、活発に細胞分裂をしており、指数関数的に増殖している細胞である。「細胞増殖制御の喪失」は、細胞分裂の適当な制限を正常に保つ細胞周期制御を失った細胞の特性を示す。そのような制御を失った細胞は、刺激性の信号なしに正常な速度より急速に増殖し、そして阻害シグナルに反応しない。

【0049】

「進行癌」は、初期の腫瘍部位にもはや留まらなくなった癌、または対癌米国合同委員会(American Joint Committee on Cancer)(AJCC)によるステージIIIまたはIVにある癌を意味する。

30

【0050】

「寛容性が高い」は、処置の結果として生じ、処置決定に影響を及ぼし、健康状態の不都合な変化がないことを示す。

【0051】

「転移性」は、乳房脂肪体の注射に応じて免疫不全マウスの消化管、腎臓、膵臓、卵巣、肺、肝臓、骨または脳に、および/または免疫不全マウスの循環器中で続発性腫瘍病変を確立することができる腫瘍細胞、例えばヒト上皮癌、結腸直腸癌、胃癌、口腔癌、膵癌、卵巣癌または腎細胞癌を示す。

40

【0052】

「非転移性」は、乳房脂肪体および/または循環への注射によっては免疫不全マウスにおいて上皮細胞転移、例えば結腸直腸癌、胃癌、口腔癌、膵癌、卵巣癌または腎細胞癌の肺、肝臓、骨または脳または他の標的器官で続発性腫瘍病変を確立することができない腫瘍細胞、例えばヒト上皮癌細胞を示す。非転移性として本明細書中で用いられ、本明細書中で扱われるヒト腫瘍細胞は、免疫不全マウスの乳房脂肪体への注射によって原発腫瘍を確立できるが、その原発腫瘍から伝播することができない。

【0053】

本明細書中で用いられる「リンパ球」は、当分野の通常の意味を有し、血液、リンパおよびリンパ組織で見出される単核白血球、非食細胞白血球、例えばBリンパ球およびT

50

リンパ球を示す。

【0054】

「ホルモン失調に起因する疾病」は、哺乳動物被検体におけるゴナドトロピン・ホルモン、例えばヒト絨毛性ゴナドトロピンの不均衡に起因する疾病を示す。ホルモン失調に起因する疾病は、限定するものではないが、前立腺癌、多嚢胞性卵巣疾病、リウマチ性疾患、敗血症性ショック、子宮内膜症、平滑筋腫、細胞毒性化学療法期間中の卵巣の変性またはアルツハイマー病を含む。「ホルモン失調に起因する疾病」は、哺乳動物被検体におけるゴナドトロピン・ホルモン、例えば卵胞刺激ホルモン(FSH)、黄体形成ホルモン(LH)または甲状腺刺激ホルモン(TSH)の不均衡に起因する疾病をさらに意味する。

10

【0055】

本明細書中で用いられる「ポリペプチド断片」は、アミノ末端基および/またはカルボキシ末端欠失があるが、残りのアミノ酸配列は、例えば、全長cDNA配列から推論される天然の配列に対応する位置と同一であるポリペプチドを示す。断片は、典型的に少なくとも5個、6個、8個のまたは10個のアミノ酸長、望ましくは少なくとも14個のアミノ酸長、より望ましくは少なくとも20個のアミノ酸長、通常少なくとも50個のアミノ酸長、さらに望ましくは少なくとも70個のアミノ酸長である。本明細書中で用いられる用語「類似体」は、推論アミノ酸配列の一部と実質的な同一性を有する、少なくとも25個のアミノ酸の部分を含むポリペプチドを示し、そして、以下の特性：(1)適切な結合状態の下で、ヒト絨毛性ゴナドトロピン鎖に対する特異的な結合、(2)黄体形成ホルモン(LH)/hCG受容体に対する-hCGの結合を阻害する能力、または(3)インビトロまたはインビボで-hCG発現細胞が増殖する能力、のうちの少なくとも1つを有する。典型的に、ポリペプチド類似体は天然の配列に関して保存的アミノ酸置換(または付加または欠失)を含む。類似体は、典型的には、少なくとも20個のアミノ酸長、望ましくは少なくとも50個のアミノ酸長またはそれ以上であって、しばしば全長の天然ポリペプチドの長さであってもよい。

20

【0056】

ペプチド類似体は、鑄型ペプチドの特性と類似した特性を有する非ペプチド薬として、一般に医薬産業で用いられる。これら非ペプチド型の化合物は、「ペプチド模倣体」または「ペプチド模倣物」と称される。Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15: 29, 1986; Veber およびFreidinger TINS p. 392 (1985); およびEvansら、J. Med. Chem. 30: 1229, 1987(これらは、出典明示により本明細書の一部とされる)。そのような化合物は、しばしば、コンピュータ処理による分子モデリングの助けを借りて開発される。治療上有用なペプチドと構造上類似するペプチド模倣体は、同等の治療上の効果もしくは予防効果を生じさせるために用いることができる。通常、ペプチド模倣物は、パラダイム・ポリペプチド(すなわち、生化学特性または薬理活性を有するポリペプチド)、例えばヒト抗体と構造上類似しているが、以下の群： $-CH_2NH-$ 、 $-CH_2S-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH=CH-$ (シスおよびトランス)、 $-COCH_2-$ 、 $-CH(OH)CH_2-$ および $-CH_2SO-$ から選択される結合と、当分野で周知の方法により置換されていてもよい1つまたはそれ以上のペプチド結合を有する。同じ型のD-アミノ酸による共通配列の1つまたはそれ以上のアミノ酸の系統的な置換(例えばL-リジンの代わりにD-リジン)は、より安定なペプチドを生成するために用いることができる。加えて、共通配列または実質的に同一となる共通配列の変化を含む制約的な(constrained)ペプチドは、当分野で既知の方法(RizoおよびGierasch Ann. Rev. Biochem. 61: 387, 1992(出典明示により本明細書の一部とされる))によって;例えば、ペプチドを環化する分子内ジスルフィド架橋を形成することができる内部のシステイン残基を加えることによって作り出すことができる。

30

40

【0057】

ポリペプチドに適用される用語「実質的な同一性」は、例えば、デフォルト・ギャップ・ウェイト(gap weight)を用いるプログラムGAPまたはBESTFITによって最適

50

に整列された場合に、2つのペプチド配列が、少なくとも80パーセントの配列同一性、好ましくは少なくとも90パーセントの配列同一性、より好ましくは少なくとも95パーセントの配列同一性、最も好ましくは少なくとも99パーセントの配列同一性を共有することを意味する。好ましくは、同一でない残基位置は、保存的アミノ酸置換により異なる。保存的アミノ酸置換は、類似の側鎖を有する残基との互換を示す。例えば、脂肪族側鎖を有する一群のアミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンである；アミド含有側鎖を有する一群のアミノ酸は、アスパラギンおよびグルタミンである；芳香族側鎖を有する一群のアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンである；塩基性側鎖を有する一群のアミノ酸は、リジン、アルギニンおよびヒスチジンである；そして、硫黄含有側鎖を有する一群のアミノ酸は、システインおよびメチオニンである。好ましい保存的アミノ酸置換群は、バリン・ロイシン・イソロイシン、フェニルアラニン・チロシン、リジン・アルギニン、アラニン・バリン、グルタミン酸・アスパラギン酸およびアスパラギン・グルタミンである。

10

20

30

40

50

【0058】

本明細書中で述べられるように、抗体または免疫グロブリン分子のアミノ酸配列における僅かな変異は、アミノ酸配列の変異体が、少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%および最も好ましくは99%の相同性を維持する場合、本発明に包含されると考えられる。特に、保存的アミノ酸置換が考えられる。保存的アミノ酸置換体は、全体の相同性に対するものではなく、それは、少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%および最も好ましくは99%の相同性を維持し得る。保存的置換は、それらの側鎖と関係があるアミノ酸ファミリー内で生じるものである。遺伝的にコードされたアミノ酸は、通常、ファミリー：(1)酸性=アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩；(2)塩基性の=リジン、アルギニン、ヒスチジン；(3)無極性=アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；および(4)非電化極性=グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシンに分けられる。より好ましいファミリー：セリンおよびスレオニンは、脂肪族ヒドロキシ・ファミリーである；アスパラギンおよびグルタミンは、アミド含有ファミリーである；アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンは、脂肪族ファミリーである；そして、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンは、芳香族のファミリーである。例えば、ロイシンのイソロイシンまたはバリンによる、アスパラギン酸塩のグルタミン酸塩による、スレオニンのセリンによる単一の置換、またはあるアミノ酸の構造的に関連したアミノ酸による類似の置換が、特にその置換がフレームワーク内のアミノ酸を含まない場合、結果として生じる分子の結合性または特性に大きな影響を及ぼさないと予想することは合理的である。アミノ酸変化が機能的なペプチドになるかどうかは、ポリペプチド誘導体の比活性を検定することで容易に決定できる。アッセイは、本明細書中で詳細に記載される。抗体または免疫グロブリン分子の断片または類似体は、当業者によって容易に調製され得る。断片または類似体のアミノ末端およびカルボキシ末端は、機能ドメインの境界の近くで生じることが好ましい。構造ドメインおよび機能ドメインは、そのヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列データの、公共のもしくは所有者の配列データベースとの比較によって同定し得る。好ましくは、コンピュータ処理による比較法を用い、既知の構造および/または機能を有する他の蛋白質にある配列のモチーフまたは予想される蛋白高次構造領域を同定する。既知の三次元構造に折りたたまれる蛋白質配列を同定する方法は既知である。Bowieら、Science 253: 164, 1991。このように、上記の例は、当業者が本発明に従って、構造ドメインおよび機能ドメインを明らかにするために用いることができる配列モチーフと構造上のコンフォメーションを認識し得ることを示す。

【0059】

好ましいアミノ酸置換は：(1)蛋白質分解に対する感受性を低減するもの、(2)酸化に対する感受性を低減するもの、(3)蛋白質複合体形成のための結合親和性を変化させるもの、(4)結合親和性を変化させるもの、および、そのような類似体の他の物理化

学的特定もしくは機能的特性を与えるかまたはモディファイするものがある。類似体は、天然のペプチド配列以外の配列のさまざまな突然変異蛋白質を含んでもよい。例えば、単一もしくは複数のアミノ酸置換（好ましくは保存的アミノ酸置換）は、天然の配列に（好ましくは、分子間接触を形成するドメイン（群）の外側のポリペプチド部分に）生じてもよい。保存的アミノ酸置換は、親配列の構造上の特徴を実質的には変えないものである（例えば、置換アミノ酸は、親配列にあるヘリックスを破壊するものであってはならず、また親配列を特徴づける他のタイプの二次構造を崩壊してはならない）。当分野で認められたポリペプチドの二次構造および三次構造の例は、Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton編、W. H. FreemanおよびCompany, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. BrandenおよびJ. Tooze編、Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); およびThorntonら、Nature 354: 105, 1991（出典明示により本明細書の一部とされる）に記載されている。

【0060】

「抗体」または「抗体ペプチド（群）」は、インタクト（無傷な）抗体または無傷の抗体と特異的結合に関して競合するその結合断片を意味する。結合断片は、組換えDNA技術によって、または、無傷の抗体の酵素的分解もしくは化学分解によって産生される。結合断片は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fvおよび一本鎖抗体が含まれる。無傷の「抗体」は、ジスルフィド結合によって相互連結された少なくとも2つの重鎖（H）および2つの軽鎖（L）を含む。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書中HCVRまたはVHと略記される）と重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、3つのドメインCH1、CH2およびCH3を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書中LCVRまたはVLと略記される）と軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、1つのドメインCLを含む。VHとVL領域は、相補性決定領域（CDR）と称され、フレームワーク領域（FR）と称されるより保存された領域で分断された超可変領域に更に分類され得る。各VHおよびVLは、3つのCDRと4つのFRから成り、以下の順序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4でアミノ末端からカルボキシル末端まで配列されている。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫グロブリンの、免疫系のさまざまな細胞（例えばエフェクター細胞）と古典的な補体系の第1の成分（C1q）を含む宿主組織または因子との結合を媒介し得る。用語、抗体は、-hCGを結合する能力を保持する無傷の抗体の抗原結合部分を含む。結合体の例には、(i) Fab断片、VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価の断片；(ii) F(ab')断片、ヒンジ領域でジスルフィド結合により連結された2つのFab断片を含む二価のFab断片；(iii) VHとCH1ドメインからなるFd断片；(iv) 抗体の一本のアームのVLおよびVHドメインからなるFv断片、(v) VHドメインからなるdAb断片(Wardら、Nature 341: 544-546, 1989)；ならびに(vi)単離された相補性決定領域（CDR）が含まれる。

【0061】

「二重特異性」もしくは「二重機能性」抗体以外の抗体は、それぞれ同一の結合部位を有すると理解される。過剰の抗体が少なくとも約20%、40%、60%または80%、および、より一般的には約85%を超えて（インビトロでの競合結合測定で測定される）、カウンター受容体に結合される受容体の量を低下させる場合、抗体は受容体のカウンター受容体に対する付着を実質的に阻害する。

【0062】

「Fab抗体」または「Fab断片」は、免疫グロブリン定常領域の全部または一部を失っており、抗体のFab領域を含んでいる抗体断片を示す。Fab抗体は、本明細書中で記載されるように調製される。

【0063】

「一本鎖抗体」または「一本鎖Fv(scFv)」は、Fv断片、VLとVHの2つのドメインの抗体融合分子を示す。Fv断片、VLとVHの2つのドメインは別々の遺伝子にコードされるが、組換え方法を用い、VLとVH領域が対となって一価の分子を形成し

、それらを単一のタンパク鎖とし得る合成リンカーにより連結することができる（一本鎖 Fv (s c F v) として知られている；例えば、Birdら、Science 242: 423-426, 1988；およびHustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883, 1988を参照のこと）。そのような一本鎖抗体は、組換え技術または無傷の抗体の酵素的分解もしくは化学的分解により調製することができる、用語「抗体」断片に対する言及に含まれる。

【0064】

「ヒト配列抗体」は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列から誘導された可変および定常領域（存在する場合）を有する抗体を含む。本発明のヒト配列抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列にコードされないアミノ酸残基（例えばインビトロでのランダムもしくは部位特異的突然変異生成によって、または、インビボでの体細胞突然変異によって導入される突然変異）を含んでもよい。そのような抗体は、例えば、国際公開第01/14424号パンフレットおよび第00/37504号パンフレットに記載されるように、ヒト以外のトランスジェニック動物で生成することができる。しかしながら、本明細書中で用いられる用語「ヒト配列抗体」は、別の哺乳動物種、例えばマウスの生殖細胞系から誘導されたCDR配列がヒト・フレームワーク配列に埋め込まれた抗体（例えばヒト化抗体）を含むことを意図しない。

10

【0065】

また、組換え免疫グロブリンが産生されてもよい。Cabilly、米国特許第4,816,567号（全ての目的について、その全部を出典明示により本明細書の一部とする）；およびQueenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033, 1989。

20

【0066】

「モノクローナル抗体」は、単一の分子組成の抗体分子の調製物を意味する。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対して単一の結合特異性と親和性を示す。したがって、用語「ヒト・モノクローナル抗体」は、可変部分と定常領域（存在する場合）がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列から誘導された単一の結合特異性を示す抗体を意味する。1つの実施形態において、ヒト・モノクローナル抗体は、ヒト重鎖導入遺伝子と軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するヒト以外のトランスジェニック動物（例えばトランスジェニックマウス）から得られたB細胞を不死化細胞と融合させたハイブリドーマにより産生される。

【0067】

「ポリクローナル抗体」は、細胞表面受容体またはリガンド、例えばLH/hCG受容体に結合する - hCGに対する1種超（2種もしくはそれ以上）の様々な抗体調製物を示す。そのような調製物は、LH/hCG受容体と結合する - hCGの範囲に結合する抗体を含む。同様に、 - hCGに対する抗体は、LH/hCG受容体と結合して、したがってLH/hCG受容体に結合する - hCGを阻害するペプチド模倣物として作用し得る。本発明の使用に適している抗体および他の抗体は、当分野で周知のおよび/または本明細書中の引用文献に記載の方法により調製され得る。好ましい実施形態において、本発明で用いられる抗 - hCG抗体は、「ヒト抗体」、例えば、ヒトから単離された抗体、あるいは「ヒト配列抗体」である。

30

【0068】

「免疫細胞応答」は、結果として免疫細胞遊走、標的細胞の殺害、貪食作用、抗体の産生、免疫応答の他の可溶性作動因子およびその他の類似物を生じる、免疫細胞の生化学変化を起させる外部もしくは内部刺激（例えば抗原、細胞表面受容体、 - hCG、LH/hCG受容体、サイトカイン、ケモカインおよび他の細胞）に対する免疫系細胞の反応を意味する。

40

【0069】

「免疫応答」は、リンパ球、抗原提示細胞、食細胞、顆粒球、そして上記の細胞または肝臓によって産生される可溶性巨大分子（抗体、サイトカインおよび補体を含む）の共同作用であり、結果として癌細胞、転移性腫瘍細胞、転移性上皮癌、結腸直腸癌、胃癌、口腔癌、膵癌、卵巣癌または腎細胞癌、侵入した病原体、病原体に感染している細胞または

50

組織、あるいは自己免疫もしくは病理学的炎症の場合には、正常なヒトの細胞または組織の選択的な破損、人体から排除または除去となる作用を示す。

【0070】

「Tリンパ球応答」と「Tリンパ球活性」は、本明細書中交換可能に用いられ、Tリンパ球に依存する免疫応答成分を意味する（例えばヘルパーTリンパ球、細胞障害性キラーTリンパ球またはサプレッサーTリンパ球へのTリンパ球の増殖および/または分化、抗体産生を生じるかもしくは妨げるBリンパ球に対するヘルパーTリンパ球によるシグナルの供給、細胞障害性リンパ球による特異的な標的細胞の殺害と他の免疫細胞の機能をモジュレートするサイトカインのような可溶性因子の放出）。

【0071】

癌の処置

抗体組成物、例えば特異的にヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）の - L2ループと結合する抗体によるLH/hCG受容体に対する - hCG結合の阻害は、患者における癌細胞に対する記憶または二次免疫応答を増強し得る。hCGに対する抗体は、免疫を促進するため、免疫原作用剤、例えば癌細胞、精製された腫瘍抗原（組換え蛋白質、ペプチドと炭水化物分子を含む）、細胞ならびに免疫刺激性サイトカインおよび細胞表面抗原をコードする遺伝子でトランスフェクションされた細胞と組み合わせられてもよいし、あるいは単独で用いられてもよい。

【0072】

ワクチン接種手順に続く場合、 - hCGに対する抗体は効果的である。腫瘍に対するワクチン接種に関する多くの実験方策が考案された（Rosenberg, ASCO Educational Book Spring: 60-62, 2000; Logothetis, ASCO Educational Book Spring: 300-302, 2000; K hayat, ASCO Educational Book Spring: 414-428, 2000; Foon, ASCO Educational Book Spring: 730-738, 2000を参照のこと；また、Restifoら、Cancer: Principles and Practice of Oncology, 61: 3023-3043, 1997も参照のこと）。これらの方策のうちの一つでは、ワクチンは、自己由来のまたは同種異系の腫瘍細胞を用いて調製される。これらの細胞ワクチンは、腫瘍細胞をGM-CSFを発現するよう形質導入した場合、最も効果的であることが示された。GM-CSFが、腫瘍ワクチン接種に対する抗原提示の強力なアクチベーターであることが示された。Dranoffら、Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A., 90: 3539-43, 1993。

【0073】

- hCGに対する抗体は、GM-CSFモディファイされた腫瘍細胞ワクチンを増強し、乳癌（Hurwitzら、1998、上掲）、原発性前立腺癌（Hurwitzら、1998、上掲）および黒色腫（van Elsasら、J. Exp. Med., 190: 355-66, 1999）のような多くの実験腫瘍モデルにおいてワクチンの効能を改善する。これらの例において、非免疫原性腫瘍、例えばB16黒色腫は、免疫系による破壊を受けやすくなった。腫瘍細胞ワクチンは、IL2のような他の免疫アクチベーターとそれらの間の副刺激分子の発現をモディファイし得る。

【0074】

「抗腫瘍薬」は、ヒトで腫瘍、特に悪性（癌）病変、例えば癌腫、肉腫、リンパ腫または白血病の発症または進行を抑制する機能特性を有する作用剤を意味するものとして本明細書中で用いられる。しばしば、転移の抑制は抗腫瘍薬の特性である。

【0075】

腫瘍疾患の処置方法において、化学療法剤は、 - hCGに対するモノクローナル抗体（例えば、hCGの - L2ループと特異的に結合する抗体）と組み合わせられてもよい。 - hCGに対する抗体を含む抗体-細胞毒素結合体（コンジュゲート）は、標準的な癌治療を通じて誘導される免疫を増強するために用いることができる。この例において、投与される化学療法試薬の用量を低下させることが可能であり得る（Mokyrら、Cancer Research 58: 5301-5304, 1998）。 - hCGに対する抗体と化学療法の併用法の背景となる科学的根拠は、多くの化学療法化合物の細胞障害作用の結果である細胞死が、抗原提示経路における腫瘍抗原の増加レベルをもたらすはずであるということである。この

10

20

30

40

50

ように、 α -hCGに対する抗体は、腫瘍細胞の化学療法物質の放出に感作された免疫応答を増強し得る。 α -hCGに対する抗体を用いた処置と組み合わせられる化学療法剤の例としては、限定するものではないが、放線菌またはストレプトマイセス属抗生物質、デュオカルマイシン、アルデスロイキン、アルトレタミン、アミホスチン、アスパラギナーゼ、プレオマイシン、カベシタピン、カルボプラチン、カルムスチン、クラドリピン、シサプリド、シスプラチン、シクロホスファミド、シタラピン、ダカルバジン(DTIC)、ダクチノマイシン、ドセタキセル、ドキシソルピシン、ドロナビノール、デュオカルマイシン、エポエチン・アルファ、エトポシド、フィルグラスチム、フルダラビン、フルオロウラシル、ゲムシタピン、グラニセトロン、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イホスファミド、インターフェロン、イリノテカン、ランソプラゾール、レバミゾール、ロイコポリン、メゲストロール、メスナ、メトトレキセート、メトクロプラミド、マイトマイシン、ミトタン、ミトキサントロン、オメプラゾール、オンダンセトロン、パクリタキセル(タキソール(登録商標))、ピロカルピン、プロクロルペラジン、リツキシマブ、サブロイン(saproin)、タモキシフェン、タキソール、塩酸トポテカン、トラスツズマブ、ビンブラスチン、ピンクリスチンと酒石酸ビノレルピンが挙げられる。前立腺癌処置について、抗 α -hCGと組み合わせ得る好ましい化学療法剤は、パクリタキセル(タキソール)である。黒色腫瘍治療について、抗 α -hCGと組み合わせ得る好ましい化学療法剤は、ダカルバジン(DTIC)である。

10

【0076】

「固形腫瘍」は、限定されるものではないが、肉腫、黒色腫、癌腫または他の固形腫瘍癌を含む。

20

【0077】

「肉腫」は、胎児結合組織のような物質から成る腫瘍を示し、通常、小繊維もしくは均一な物質に埋没する緊密に集合した細胞から成る。肉腫には、限定されるものではないが、軟骨肉腫、線維肉腫、リンパ肉腫、黒色肉腫、粘液肉腫、骨肉腫、アベメチ(Abemethy)肉腫、脂肪肉腫、脂肪肉腫、胞状軟部肉腫、エナメル上皮肉腫、ブドウ状肉腫、緑色腫肉腫、絨毛腫、胎児性肉腫、ウィルムス腫瘍肉腫、子宮内膜肉腫、間質性肉腫、ユーイング肉腫、筋膜肉腫、線維形成肉腫、巨細胞肉腫、顆粒球性肉腫、ホジキン肉腫、特発性多発性着色出血肉腫、B細胞の免疫芽球性肉腫、リンパ腫、T細胞の免疫芽球性肉腫、イエーンセン肉腫、カポジ肉腫、クッパー星細胞肉腫、血管肉腫、白血肉腫、悪性間葉腫肉腫、傍骨性骨肉腫、細網肉腫、ラウス肉腫、漿液嚢胞性肉腫、滑膜肉腫と毛細血管拡張性肉腫が含まれる。

30

【0078】

「黒色腫」は、皮膚と他の器官の色素細胞系に起因する腫瘍を示す。黒色腫には、例えば、末端部黒子黒色腫、メラニン欠乏性黒色腫、良性若年性黒色腫、クラウドマン黒色腫、S91黒色腫、ハーディングパッセー黒色腫、若年性黒色腫、悪性黒子型黒色腫、悪性黒色腫、結節性黒色腫、爪下黒色腫と表在拡大型黒色腫が含まれる。

【0079】

「癌腫」は、周囲の組織を浸潤し転移を引き起こす傾向のある上皮細胞から成る悪性腫瘍を示す。典型的な癌腫は、例えば、腺房癌腫、小葉癌、腺嚢癌腫、腺様嚢胞癌、腺癌、副腎皮質の癌腫、槽癌腫、肺胞細胞癌、基底細胞癌、基底細胞癌、類基底細胞癌、基底有棘細胞癌、肺胞上皮癌、細気管支癌、気管支原性癌、大脳様癌腫、胆管細胞癌、絨毛癌、膠様癌、面胞癌、子宮体部癌、篩状癌、鑑状癌、皮膚癌、円筒状癌腫、円柱細胞癌腫、腺管癌、癌腫デューラム(carcinoma durum)、胎生期癌、髓様癌、類表皮癌、咽頭上皮癌腫(carcinoma epitheliale adenoides)、外方増殖性癌腫、癌腫X潰瘍(carcinoma ex ulcere)、線維癌、膠様癌、膠状癌腫、巨細胞癌、カルシノーマ・ギガトセルラー(carcinoma gigantocellulare)、腺癌、顆粒膜細胞癌腫、毛母癌、血様癌、肝細胞癌、ヒュルトレ細胞癌、硝子質癌腫、ハイパーメフォロイド・カルシノーマ(hypemephroid carcinoma)、小児胎生期癌、上皮内癌、表皮内癌、上皮内癌腫、Krompecher癌腫、Kulchitzky-細胞癌腫、大細胞癌腫、レンズ形癌腫、レンズ状癌腫、脂肪腫様癌、リンパ上皮癌、延髄

40

50

癌腫、髓様癌、黒色癌、軟性癌腫、粘液性癌腫、粘液分泌癌、粘膜細胞癌腫、表皮粘膜癌腫 (mucoepidermoid carcinoma)、粘液癌、粘液癌腫、粘液腫様癌、鼻咽腔癌、燕麦細胞癌、骨化性癌、骨状癌腫、乳頭状癌、門脈周囲癌、上皮内癌、有棘細胞癌腫、浸軟癌腫、腎臓の腎細胞癌、予備細胞癌、肉腫様癌、シュナイダー癌腫、硬癌、陰囊癌、印環細胞癌、単純癌、小細胞型癌腫、ソラノイド・カルシノーマ (solanoid carcinoma)、回転楕円面細胞癌腫、紡錘体細胞癌、海綿様癌、扁平上皮癌、扁平上皮癌、ストリング癌腫、血管拡張癌、毛細血管拡張症様癌腫、移行上皮癌、結節癌、結節癌、いぼ状癌とカルシノーマ・ピフロサム (carcinoma viflosum) が挙げられる。

【 0 0 8 0 】

「白血病」は造血臓器の進行性の悪性疾患を意味し、通常、血液と骨髄中の白血球およびその前駆体の間違った増殖と発生により特徴づけられる。一般に、白血病は臨床学的に (1) 疾病の期間および特徴 - 急性または慢性；(2) 脊髄 (骨髄)、リンパ様 (リンパ行性) または単核球性；ならびに (3) 血中白血球または非白血性 (亜白血病) の異常な細胞数の増加もしくは非増加に基づいて分類される。白血病には、例えば、急性非リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、急性顆粒球性白血病、慢性顆粒球性白血病、急性前骨髄球性白血病、成人 T 細胞白血病、非白血性白血病、白血病性白血病 (leukocytchemic leukemia)、好塩基球性白血病、芽細胞白血病、ウシの白血病、慢性骨髄性白血病、皮膚白血病、幹細胞性白血病、好酸球性白血病、グロースの白血病 (Gross' leukemia)、ヘアリーセル白血病、血芽球性白血病 (hemoblastic leukemia)、血球母細胞性白血病 (hemocytoblastic leukemia)、組織球性白血病、幹細胞性白血病、急性単球白血病、白血球減少性白血病、リンパ性白血病、リンパ芽球性白血病、リンパ性白血病、リンパ性白血病、リンパ性白血病、リンパ肉腫細胞白血病、肥胖細胞白血病、骨髄巨核球性白血病、小骨髄芽球性白血病、単球性白血病、骨髄芽球性白血病、骨髄性白血病、骨髄様顆粒球性白血病、骨髄単球性白血病、ネーグリ白血病、形質細胞性白血病、プラズマ細胞性白血病、前骨髄球性白血病、リーダー細胞性白血病、シリング白血病、幹細胞性白血病、亜白血性白血病および未分化細胞白血病が挙げられる。

【 0 0 8 1 】

さらなる癌には、例えば、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、神経芽腫、乳癌、卵巣癌、肺癌、横紋筋肉腫、原発性血小板血症、原発性マクログロブリン血、小細胞型肺腫瘍、原発性脳腫瘍、胃癌、大腸癌、悪性膵島細胞腫、悪性カルチノイド、膀胱癌、前悪性皮膚病変、精巣癌、リンパ腫、甲状腺癌、神経芽腫、食道癌、尿生殖路癌、悪性高カルシウム血症、子宮頸癌、子宮内膜癌、副腎皮質性癌と前立腺癌が挙げられる。

【 0 0 8 2 】

抗体の構造

基本的な抗体構造上の単位は、四量体から成ることは知られている。各四量体は 2 対の同一のポリペプチド鎖から成り、各対は 1 個の「軽鎖」(約 25 kDa) と 1 個の「重鎖」(約 50 - 70 kDa) を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識に關与する約 100 個 ~ 110 個もしくはそれ以上のアミノ酸から成る可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、主に作動因子機能に關与する定常領域を特徴とする。ヒト軽鎖は、カッパとラムダ軽鎖とに分類される。重鎖は μ 、 δ 、 γ 、 α または ϵ に分類され、それぞれ、抗体のアイソタイプは、IgM、IgD、IgG、IgA と IgE と定義される。軽鎖および重鎖内で、可変領域と定常領域は、重鎖で、約 12 個またはそれ以上のアミノ酸からなる「J」領域により、約 10 個以上のアミノ酸からなる「D」領域と連結される。一般的に、Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W 編、第 2 版、Raven Press, N.Y. (1989)) (すべての目的について、その全部を出典明示により一部とする) を参照のこと。各一对の軽鎖 / 重鎖の可変領域は、抗体結合部位を形成する。

【 0 0 8 3 】

したがって、無傷の IgG 抗体は、2 つの結合部位を有する。二重機能性抗体または二重特異性抗体を除き、その 2 つの結合部位は同じものである。

【 0 0 8 4 】

10

20

30

40

50

この鎖はすべて、比較して保全されたフレームワーク領域 (FR) が 3 個の超可変領域 (相補性決定領域または CDR とも称される) で連結された、同一の一般的構造を示す。各対の 2 個の鎖の CDR は、特定のエピトープに対する結合を可能にするようにフレームワーク領域により配置される。軽鎖および重鎖の両方は、N 末端から C 末端にかけ、ドメイン FR 1、CDR 1、FR 2、CDR 2、FR 3、CDR 3 および FR 4 を含む。各ドメインのアミノ酸配置は、Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991))、または Chothia および Lesk J. Mol Biol. 196: 901-917, 1987; Chothia ら、Nature 342: 878-883, 1989 の定義に従う。

【0085】

二重特異性抗体または二重機能性抗体は、2 個の異なる 1 対の重鎖 / 軽鎖と 2 個の異なる結合部位を有する人工ハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合または Fab 断片を連結することを含む種々の方法によって産生され得る。例えば、Songsivilai および Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321, 1990、Kostelny ら、J. Immunol. 148: 1547-1553, 1992 を参照のこと。加えて、二重特異性抗体は、「ディアボディ (diabody)」として形成され得る (Holliger ら、PNAS USA 90: 6444-6448, 1993 または「Janusins」 (Traunecker ら、EMBO J. 10: 3655-3659, 1991 および Traunecker ら、Int J Cancer 7:51-52, 1992)。二重特異性抗体の産生は、従来の抗体の産生と比較してと相対的に困難な過程であり得るし、二重特異性抗体については、通常、収率および精製度はより低い。二重特異性抗体は、単一の結合部位を有している断片の形態 (例えば Fab、Fab' および Fv) では存在しない。

【0086】

Fab または scFv フェージライブラリー

- hCG と特異的に結合する抗体組成物、例えば、hCG の - L2 ループと特異的に結合する抗体、または転移細胞のリガンドまたは細胞表面受容体、例えば、LH / hCG 受容体と特異的に結合する抗体を特定するためのフェージディスプレイ・ライブラリー法には、Fab、一本鎖 Fv (scFv) フェージライブラリーの使用がある。例えば、Huston ら、Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A., 85: 5879-5883, 1988; Chaudhary ら、Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A., 87: 1066-1070, 1990; Zhang ら、J. Virol. 78: 9233-9242, 2004 を参照のこと。バクテリオフェージ・コート蛋白質上に提示された Fab または scFv ライブラリーのさまざまな例が記載されている。フェージディスプレイ法の改良法も知られており、例えば、第 96 / 06213 号パンフレットおよび第 92 / 01047 号パンフレット (Medical Research Council ら) および第 97 / 08320 号パンフレット (Morphosys) に記載されており、それらは出典明示により本明細書の一部とされる。Fab ライブラリーの提示 (ディスプレイ) は既知であり、第 92 / 01047 号パンフレット (CAT / MRC) および第 91 / 17271 号パンフレット (Affymax) に記載されている。

【0087】

ハイブリッド抗体またはその抗体断片はフェージまたはフェージミド粒子の表面に存在することになるので、良好な結合活性を維持した変異型を確認するために、ディスプレイベクターにクローニングされるハイブリッド抗体またはハイブリッド抗体断片は、転移細胞と関係する適当な抗原、例えば、細胞表面受容体または転移腫瘍細胞の細胞表面受容体に対するリガンドに対して選択され得る。例えば、Barbas III ら、Phage Display, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001 (これらの開示内容は出典明示により本明細書の一部とされる) を参照のこと。例えば、Fab 断片の場合、軽鎖と重鎖の Fd 産物は、lac プロモーターの制御下にあり、そして各鎖は、細菌宿主の細胞膜周辺腔に向かうための、それに融合されたリーダーシグナルを有する。その空間で、抗体断片は適切に組み立てられ得る。重鎖断片は、組み立てられた抗体断片が新たに作られるフェージまたはフェージミド粒子の被膜に組み込まれることを可能にするフェージ・コート蛋白質ドメインとの融合体として発現される。新しい

10

20

30

40

50

ファージミド粒子の形成には、必要なファージ遺伝子のすべてを含むヘルパーファージの添加が必要である。抗体断片のライブラリがファージまたはファージミド表面に提示されたら、パニングと称される過程を続ける。これは、i) ファージまたはファージミド粒子の表面上に提示された抗体を、所望の抗原に結合させる、ii) 非結合体を洗い流す、iii) 結合した粒子を抗原から溶出する、そして、iv) 溶出された粒子をさらなる選択ラウンドのため、それに富むプールを増幅するにあたって、新鮮な細菌宿主に曝すことによる方法である。典型的に、パニングは、3ラウンドまたは4ラウンド、特異的に結合する抗体クローンのスクリーニングの前に実施される。このように、ファージ/ファージミド粒子は、結合表現型(抗体)と遺伝子型(DNA)との連結を可能にし、抗体のディスプレイ技術の使用は、よい結果をもたらす。しかしながら、他のベクター形式は、このヒト化過程(選択および/またはスクリーニングのために溶菌ファージ・ベクター(修飾されたT7またはラムダZap系)に抗体断片ライブラリのクローンを作ること)の間用いられることができた。しかしながら、他のベクター形式は、例えば、選択および/またはスクリーニングのために溶菌ファージ・ベクター(モディファイされたT7またはラムダZapシステム)に抗体断片ライブラリをクローニングする、ヒト化過程に用いることができた。

10

【0088】

所望のハイブリッド抗体および/またはハイブリッド抗体断片の選択後、それらは、当業者に既知の技術のいずれか、例えば、原核細胞もしくは真核生物細胞発現、およびその他の類似の方法によって、大容量に産生し得ることが考えられる。例えば、ハイブリッド抗体または断片は、抗体重鎖をコードする発現ベクターを構築する従来技術を用いることにより作製することができ、そのCDRと、要すれば元の種の抗体結合特異性を維持するのに必要とされる可変領域のフレームワークの最小部分は元の種の抗体から誘導され(本明細書に記載の技術に従って作製される)、そしてその抗体の残りの部分は、本明細書に記載のように操作することができる目的とする種の免疫グロブリンから誘導され、それによりハイブリッド抗体重鎖の発現用ベクターが作製される。

20

【0089】

詳細な実施形態において、Fabまたは一本鎖Fv(scFv)抗体ライブラリは、5例、10例、15例または20例またはそれ以上の様々な癌疾病患者の末梢血リンパ球から調製されてもよい。次いで、完全なヒトの高親和性FabまたはscFv抗体は、合成シアリルLewis^xおよびLewis^xBSA結合体を用いることにより選択することができる。1つの試験で、膵臓腺癌細胞の細胞表面に結合することがELISA、BIACoreおよび流動細胞計測法結合により実証され、これらのヒトscFv抗体はシアリルLewis^xとLewis^xに特異的であった。ヌクレオチド配列決定は、少なくとも4個の独自のscFv遺伝子が得られたことを明らかにした。Kd値は、1.1~6.2×10⁻⁷Mの範囲にあり、二次免疫応答で誘導されるmAbの親和性に相当した。これらの抗体は、糖鎖抗原の構造と機能を調査するための、そしてヒト腫瘍疾病の処置に有益な試薬であり得る。Maoら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 6953-6958, 1999。

30

【0090】

さらなる詳細な実施形態において、ファージに提示された組合せの抗体ライブラリは、転移細胞と関連した適当な抗原、例えば細胞表面受容体または転移腫瘍細胞の細胞表面受容体のリガンドに対する、多種多様な抗体を作り出し、選択するために用いることができる。ファージ・コート蛋白質pVIIおよびpIXは、抗体Fv領域のヘテロ二量体構造を提示するのに用いることができる。この技術の態様は、線状バクテリオファージのpIX上に提示された4.5×10⁹メンバーの大きいヒトFabまたは一本鎖Fv(scFv)ライブラリを構築するために拡張された。さらに、ライブラリの多様性、質および有用性は、6個の異なる蛋白抗原に対するFabまたはscFvクローンの選択によって実証された。特に、選択されたクローンの90%以上は、わずか3ラウンドのパニングの後、それぞれの抗原に対して陽性結合を示した。分析されたFabまたはscFvは高親和性であることも分かった。例えば、動態解析(BIACore)で、ブドウ球菌エンテロ

40

50

トキシン (staphylococcal enterotoxin) Bとコレラ毒素 (cholera toxin) Bサブユニットに対する Fabまたは scFvは、それぞれナノモルおよびnM以下の解離定数を有することが分かり、免疫から得られたmAbと相当するか、またはそれ以上の親和性を示した。非常に異なった蛋白質間だけでなく、2個の間の配列相同性が>80%配列相同性を示す密接に関連した蛋白質、例えばトウゴマ (Ricin communis) (「リシン」) アグルチニン (RCAeoとRCAio) の場合でも、高い特異性が達成された。この結果は、pIX-ディスプレイ・ライブラリの成績が潜在的にpIII-ディスプレイ形式の成績を上回る場合があり、多種多様な標的抗原をパニングすることに理想的には適していることを示した。Gaoら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 12612-12616, 2001。

【0091】

抗体または他の結合試薬と抗原との間の特異的な結合は、少なくとも 10^{-6} Mの結合親和性を意味する。好ましい結合試薬は、少なくとも約 10^{-7} M、および好ましくは 10^{-8} M~ 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} Mまたは 10^{-12} Mの親和性でもって結合する。用語「エピトープ」は、抗体に特異的に結合できる抗原決定基を意味する。エピトープは、通常、アミノ酸または糖側鎖のような分子の化学的に活性な表面基から成り、通常、特異的な三次元構造上の特性ならびに特異的な電荷特性を有する。

【0092】

「エピトープ」は、抗体のまたはT細胞受容体の抗原結合領域の1つまたはそれ以上で抗体またはT細胞受容体により認識され、結合され得るいずれかの分子の一部を意味する。エピトープは、通常、アミノ酸または糖側鎖のような分子の化学的に活性な表面基から成り、通常、特異的な三次元構造上の特性ならびに特異的な電荷特性を有する。「エピトープを阻害および/または中和する」は、あるエピトープが抗体により結合された場合 (LH/hCG受容体に対するhCGの結合を含む)、インビボで (生体内で)、インビトロで (試験管内で) またはインシトゥーで (その場で)、より好ましくはインビボで、そのエピトープを含む分子または生物の生物活性が消失することとなるエピトープが意味される。抗体は、その解離定数が $1\mu\text{M}$ より小さい、好ましくは 100nM より小さい、そしてさらに最も好ましくは 10nM よりも小さい場合に、特異的に抗原を結合すると称される。立体構造エピトープおよび非立体構造エピトープは、変性溶媒の存在下で前者の結合性は失われるが後者は失われない点で識別される。

【0093】

本発明の抗体、その断片および領域によって認識されるエピトープは、抗-hCG活性を含む、本発明の抗体、その断片および可変領域により認識され、および/または結合する-hCGの局所的もしくは3次元エピトープを提供する、以下の-hCGのアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸のそれぞれまたは両方を含む5個またはそれ以上のアミノ酸を含んでもよく、-hCGの中和および/または阻害活性を決定するためのスクリーニング方法もまた本発明において提供される。本発明の内容において、抗-hCGの中和活性または-hCGの阻害活性は、-hCGの少なくとも1つの生物活性を阻害する-hCGを中和する化合物の能力、例えば、-hCGがLH/hCG受容体に結合することを妨げる能力、細胞内プロセッシング、例えば転写、翻訳または翻訳後修飾、細胞表面での発現、分泌、または生理活性-hCGの組み立てによる-hCGの産生を阻害する能力を意味する。加えて、-hCGを中和する化合物は、-hCG産生の上方もしくは下方調節に関わるような代謝経路の調節を誘導することによって作用し得る。別には、-hCGを中和する化合物は、そのような感受性を低下させることによって、-hCGに対する細胞の感受性をモジュレートしてもよい。-hCGを中和する化合物は、-hCG活性をインビトロで、インシトゥーまたはインビボで中和し、本発明に従って用いられる場合に-hCGを中和する化合物と考えられる抗体、その断片または一部、ペプチド、ペプチド模倣化合物または有機金属模倣化合物からなる群から選択され得る。-hCGを中和する化合物の-hCG中和活性を決定するために用いられ得るスクリーニング方法は、インビトロ・アッセイまたはインビボ・アッセイを含んでもよい。そのようなインビトロ・アッセイは、(i) BXP C-3 膀胱癌細胞のインビトロでの増

10

20

30

40

50

殖の阻害；および (i i) 約 4 n M もしくはそれ以上の抗体濃度での M C F - 7 乳癌細胞または H e L a 細胞のインビトロで増殖の阻害がないこと； (i i) L H / h C G 受容体に対する α -h C G の結合の阻害；または (i i i) 細胞遊走アッセイにおける細胞遊走の阻害に関する、アッセイを含んでいてもよい。別には、または、さらに、 α -h C G 中和化合物の α -h C G 中和活性のインビボ試験は、本明細書に記載されるように、約 4 n M またはそれ以上の抗体濃度で B X P C - 3 膵癌細胞のインビトロでの増殖の阻害についてインビトロ・アッセイを用いて試験してもよい。

【 0 0 9 4 】

「中和」は、結合が生じて、ヒト α -h C G のその特異的な受容体、L H / h C G 受容体に対する結合を妨げることによって、または、その受容体を通じて α -h C G のシグナル伝達を阻害することによって、 α -h C G 活性を阻害する抗体を示す。モノクローナル抗体は、例えば、インビトロ細胞アッセイで、例えば (i) インビトロでの B X P C - 3 膵癌細胞の増殖阻害；そして、(i i) インビトロでの M C F - 7 乳癌細胞または H e L a 細胞の増殖阻害のないことにより測定されて、 α -h C G 活性を阻害するにあたって、90%の有効性、好ましくは95%の有効性、最も好ましくは100%の有効性がある場合、中和する。

10

【 0 0 9 5 】

「試薬」は、化学化合物、生体高分子または生物学的材料から作られる抽出物の混合物を意味して、本明細書中で用いられる。

【 0 0 9 6 】

「改変された抗体」は、選択された宿主細胞で発現によって得ることができる、改変された免疫グロブリン・コード領域によってコードされる蛋白質を示す。そのような改変された抗体は、免疫グロブリン定常領域の全部または一部を欠く作り出された抗体（例えばキメラであるかヒト化抗体）または抗体断片である（例えば F v、F a b または F (a b)₂ その他の類似物）。

20

【 0 0 9 7 】

「改変された免疫グロブリン・コード領域」は、本発明の改変された抗体をコードする核酸配列を意味する。改変された抗体が CDR を移植されたかヒト化抗体であるとき、ヒト以外の免疫グロブリンからの相補性決定領域 (CDR) をコードする配列はヒト可変部分フレームワーク配列を含む第一の免疫グロブリン・パートナー中に挿入される。場合により、第一の免疫グロブリン・パートナーは、第二の免疫グロブリン・パートナーと作動可能に連結される。

30

【 0 0 9 8 】

「高親和性」は、表面プラズモン共鳴によって決定された、ヒト α -h C G に対して $3 \cdot 5 \times 10^{-11}$ M またはそれ以下の K d により特徴付けられる結合親和性を有する抗体を意味する。

【 0 0 9 9 】

「ヒト α -h C G に対する結合特異性」は、ヒト絨毛性ゴナドトロピンに対する高親和性を意味する。モノクローナル抗体は、 α -h C G に対して高い結合特異性を有しており、他の関連する h C G サブユニットまたは受容体に対しては高親和性でもって結合しない。モノクローナル抗体 m A b 2 B 2 . 6 F 5 および 2 B 3 . 3 E 8 は、 α -h C G に対して高い結合特異性を有しており、 α -h C G または L H / h C G 受容体とは結合しない。

40

【 0 1 0 0 】

用語、F v、F c、F c、F a b または F (a b)₂ は、その標準的な意味で用いられる（例えば、Harlowら、Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988) を参照のこと）。

【 0 1 0 1 】

「作り出された抗体」は、ある種の改変された抗体、すなわち全長の合成抗体（例えば抗体断片とは対照的にキメラ抗体またはヒト化抗体）であり、選択されたアクセプター抗体の一部の軽鎖および/または重鎖可変部分ドメインが、選択されたエピトープに対する

50

特異性を有する1つまたはそれ以上のドナー抗体の類似部分で置換された抗体を記載する。例えば、そのような分子は、モディファイされていない軽鎖（またはキメラ軽鎖）とのヒト化重鎖によって特徴付けられる抗体、または、その逆の抗体を含み得る。作り出された抗体は、ドナー抗体結合特異性を保持するよう、アクセプター抗体軽鎖および/または重鎖の可変部分ドメインのフレームワーク領域をコードする核酸配列の改変によって、特徴づけられ得る。これらの抗体は、アクセプター抗体からの1つまたはそれ以上CDR（好ましくは全部）の、本明細書中で記載されるドナー抗体のCDRでの置換を含み得る。

【0102】

「キメラ抗体」は、アクセプター抗体から誘導される軽鎖および重鎖定常領域と共にドナー抗体から誘導された天然の可変領域（軽鎖および重鎖）を含むある種の作り出された抗体を意味する。

10

【0103】

「ヒト化抗体」は、ヒト以外のドナー免疫グロブリンから誘導されたCDRを有し、その分子の残りの免疫グロブリン誘導部分は、1つの（またはそれ以上）ヒト免疫グロブリン（群）から誘導された、一種の作り出された抗体である。加えて、フレームワークのサポート残基は、結合親和性を保存するために改変されてもよい。例えば、Queenら、Proc. Natl Acad Sci USA, 86: 10029-10032, 1989、Hodgsonら、Bio/Technology, 2:421,1991を参照のこと。

【0104】

「ドナー抗体」は、改変された免疫グロブリン・コード領域を与え、そのドナー抗体に特有の抗原特異性と中和活性を有する改変された抗体を発現する結果となるよう、第一の免疫グロブリン・パートナーにその可変領域、CDRまたは他の機能的断片もしくは類似体の核酸配列を与える抗体（モノクローナルまたは組換え体）を意味する。

20

【0105】

「アクセプター抗体」は、第一の免疫グロブリン・パートナーにその重鎖および/または軽鎖のフレームワーク領域および/または重鎖および/または軽鎖の定常領域をコードする核酸配列の全部（または、いずれかの部分であるが、全部が好ましい）を与える、ドナー抗体と異種の抗体（モノクローナルまたは組換え体）を意味する。好ましくは、ヒト抗体がアクセプター抗体である。

【0106】

「CDR」は、抗体の相補性決定領域アミノ酸配列と定義され、それは免疫グロブリン重鎖および軽鎖の超可変領域である。例えば、Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第4版、U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)を参照のこと。3個の重鎖CDRと3個の軽鎖CDR（またはCDR領域）は、免疫グロブリンの可変領域中にある。したがって、本明細書中で用いられる「CDR」は、3個すべての重鎖CDRまたは3個すべての軽鎖CDR（また、適当な場合には重鎖CDR全部と軽鎖CDR全部の両方）を意味する。

30

【0107】

CDRは、抗体の抗原またはエピトープに対する結合に関する接触残基の大部分を与える。本発明の興味あるCDRは、ドナー抗体可変部の重鎖および軽鎖配列から誘導されるか、また、それらが誘導されたドナー抗体と同じ抗原結合特異性および/または中和能を共有または保持する天然のCDRの類似体もまた含む。

40

【0108】

例えば、「抗原結合特異性または中和能を共有する」は、例えば、mAb 2B2・6F5または2B3・3E8が特定のレベルの抗原親和性により特徴づけることができるが、適当な構造環境下にあるmAb 2B2・6F5または2B3・3E8の核酸配列によりコードされるCDRが、より低いまたはより高い親和性を有してもよいことを意味する。

【0109】

「機能的断片」は、その断片が誘導された抗体と同じ抗原結合特異性および/または中和能を保持する、部分的な重鎖または軽鎖可変部分配列（免疫グロブリン可変領域のアミ

50

ノ末端またはカルボキシ末端のわずかな欠失)である。

【0110】

「類似体」は、少なくとも1個のアミノ酸によりモディファイされたアミノ酸配列であり、該モディファイは2、3個のアミノ酸(すなわち、10個程度)の化学的もしくは置換または再編成であってもよく、そして該モディファイは、そのアミノ酸配列がモディファイされていない配列の生物学的特徴、例えば、抗原特異性および高親和性の保持を可能にする。例えば、(サイレント)突然変異は、置換を介して、特定のエンドヌクレアーゼ制限部位がCDRコード領域内にまたは付近に作り出された場合に構築され得る。

【0111】

類似体は、対立遺伝子変異として生じることがある。「対立遺伝子変異またはモディファイ」は、本発明のアミノ酸またはペプチド配列をコードする核酸配列の改変である。そのような変異またはモディファイは、遺伝暗号で縮重によるものであってもよいし、または所望の特徴を与えるために故意に作り出されてもよい。

【0112】

「担体試薬」または「エフェクター試薬」は、改変された抗体および/またはドナー抗体の天然もしくは合成の軽鎖または重鎖、またはドナー抗体の他の断片が従来法により関係する、非タンパク担体分子を意味する。そのような非タンパク担体には、診断分野で用いられる一般的な担体、例えばポリスチレンまたは他のプラスチック・ビーズ、B I A c o r e (登録商標) [ファルマシア]系で用いられるような多糖、あるいは、医薬分野で有用であり、そしてヒトおよび動物への投与にあたって安全な他の非タンパク物質が含まれる。他のエフェクター試薬には、重金属原子または放射性同位体をキレートするための巨大環が挙げられる。そのようなエフェクター試薬は、改変された抗体の半減期を増大させるために有用であり得る(例えばポリエチレングリコール)。

【0113】

免疫応答の成分は、当業者に周知の様々な方法によってインビトロで検出され得る。例えば、(1)細胞障害性リンパ球は、放射性で標識化された標的細胞と一緒にインキュベートし、そして標的細胞の溶解が放射性物質の放出によって検出され得る；(2)ヘルパーTリンパ球は、抗原および抗原提示細胞と一緒にインキュベートし、サイトカインの合成および分泌を標準方法により検出し得る(Windhagenら、Immunity, 2: 373-80, 1995)；(3)抗原提示細胞は、蛋白質抗原全体と一緒にインキュベートし、MHC上へのその抗原の提示をTリンパ球活性化アッセイまたは生物物理学的方法により検出する(Hardingら、Proc. Natl. Acad. Sci., 86: 4230-4, 1989)；(4)肥満細胞は、そのFc-イプシロン受容体を架橋する試薬と一緒にインキュベートし、ヒスタミン放出を酵素免疫学的検定により測定する(Siraganianら、TIPS, 4: 432-437, 1983)。

【0114】

同様に、モデル生物(例えばマウス)またはヒト患者における免疫応答の生成は、当業者に周知の様々な方法によって検出され得る。例えば、(1)ワクチン接種に応答する抗体の産生は、臨床検査室で一般に用いられる標準的な方法(例えばELISA)により容易に検出され得る；(2)炎症部位への免疫細胞の遊走は、皮膚の表面をひっかいて、無菌容器に配置し、そのかき傷部への遊走細胞を捕えることによって検出できる(Petersら、Blood, 72: 1310-5, 1988)；(3)有糸分裂促進物質または混合リンパ球培養反応に応答する末梢血単核細胞の増殖は、³Hチミジンを用いて測定できる；(4)PBMCの顆粒球、大食細胞と他の食細胞の食細胞能力は、ウェルに標識化粒子と共にPBMCを配置することで測定できる；および(5)免疫系細胞の分化は、CD分子、例えばCD4およびCD8に対する抗体を用いてPBMCを標識化し、これらのマーカーを発現しているPBMCの割合を測定することで測定できる。

【0115】

便宜上、免疫応答は、本発明ではしばしば「一次」もしくは「二次」免疫応答のいずれかと記載される。「防御」免疫応答とも記載される一次免疫応答は、特定の抗原、例えば細胞表面受容体、リガンド、hCGまたはLH/hCG受容体に対するいくつかの初

10

20

30

40

50

期暴露（例えば初回「免疫」）の結果として個体に生じる免疫応答を示す。そのような免疫化は、例えば、抗原（例えば、抗原を提示するか、示す一部の病原体による初感染から）に対する一部の自然暴露の結果として、または、個体中の一部の腫瘍（例えば転移性上皮癌、結腸直腸癌、胃癌、口腔癌、膵癌、卵巣癌または腎細胞癌）の癌細胞によって示される抗原から生じ得る。別には、免疫は、抗原を含むワクチンで個人にワクチン接種する結果として生じ得る。例えば、ワクチンは、癌細胞、例えば転移性上皮癌、結腸直腸癌、胃癌、口腔癌、膵癌、卵巣癌または腎細胞癌からの細胞の抗原を1つまたはそれ以上含む癌ワクチンであってよい。

【0116】

一次免疫応答は、時間とともに弱まり、もしくは減弱し得るし、消え去ってしまいさえし、減弱してそれを検出できなくなることもあり得る。したがって、本発明は、本明細書中「記憶免疫応答」とも記載される「二次」免疫応答にも関する。用語「二次免疫応答」は、一次免疫応答がすでに生じた後の個人に誘発される免疫応答を示す。したがって、二次免疫応答は、例えば、弱められたか減弱された既存の免疫応答を増強するために、または、消えたかもはや検出できない以前の免疫応答を再形成させるために、誘発し得る。二次免疫応答を誘発するために投与され得る薬剤は、その薬剤が一次免疫応答を「促進する」と言いうことができるので、後に「効果促進剤」と称される。

【0117】

例えば、制限するためのものではなく、二次免疫応答は、一次免疫応答を誘発した抗原をその個体に再び導入することによって誘発することができる（例えば、ワクチンを再び投与することによって）。しかしながら、抗原に対する二次免疫応答は、実際の抗原を含まない他の試薬を投与することによって引き起こすこともできる。例えば、本発明は、個体に -hCG に対する抗体を投与することによって二次免疫応答を強化する方法を提供する。そのような方法では、必ずしも実際の抗原が、-hCG に対する抗体と共に投与される必要があるというわけではなく、また抗体を含む組成物が、必ずしも抗原を含む必要があるというわけではない。二次または記憶免疫応答は体液性（抗体）応答か細胞応答でもよい。二次または記憶体液性応答は、最初の抗原提示で生じた記憶B細胞の刺激により生じる。遅延型過敏（DTH）反応は、CD4+細胞によって媒介されるある種の細胞性二次または記憶免疫応答である。最初の抗原暴露は免疫系を惹起し、さらなる暴露（群）はDTHの結果となる。

【0118】

「免疫学的に交差反応する」または「免疫学的に反応する」は、同じ抗原（「免疫学的に反応する」）または異なる抗原（「免疫学的に交差反応する」）を用いて産生された抗体と特異的に反応する抗原を意味する。一般に、抗原は -hCG もしくは LH/hCG 受容体またはその一部である。

【0119】

「免疫学的反応条件」は、抗原の特定のエピトープに産生された抗体が、その抗体が実質的に他の全てのエピトープと結合するより検出可能な量より多くの量で、一般にはバックグラウンド結合より少なくとも2倍、好ましくはバックグラウンドより少なくとも5倍でそのエピトープと結合することを可能にする条件を意味する。免疫学的反応条件は抗体結合反応の形式に依存し、典型的には免疫測定プロトコルで利用されるものである。免疫学的検定の形式および条件の記載については、HarlowおよびLane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988を参照のこと。

【0120】

「細胞表面受容体」は、シグナルを受けることができ、そのシグナルを細胞の形質膜を超えて伝達できる分子および分子の複合体を示す。本発明の「細胞表面受容体」の例としては、転移細胞の LH/hCG 受容体がある。

【0121】

「非特異的T細胞活性化」は、その抗原特異性に依存しないT細胞の刺激を示す。

【0122】

10

20

30

40

50

免疫応答の認識相と活性化相とは対照的に、「エフェクター細胞」は免疫応答のエフェクター相が関与する免疫細胞を示す。例示的な免疫細胞は、骨髄起源もしくはリンパ起源の細胞（例えばリンパ球（例えば細胞溶解T細胞（CTL）、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、単球、好酸球、好中球、多核白血球、顆粒球、肥満細胞および塩基好性を含むB細胞およびT細胞）を含む。エフェクター細胞は、特定のFc受容体を発現し、特定の免疫機能を行う。エフェクター細胞は、抗体依存細胞媒介細胞障害（ADCC）を誘導し得る（例えばADCCを誘導することができる好中球）。例えば、単球、マクロファージ、好中球、好酸球およびFcRを発現するリンパ球は、特異的に標的細胞を殺すこと、免疫系の他の成分に抗原を提示すること、または抗原を示す細胞に結合することに関与する。エフェクター細胞は、目標抗原、標的細胞、転移癌細胞または微生物を食菌し得る。

10

【0123】

「標的細胞」は、本発明の抗体または抗体組成物によって標的とされ得る被検体（例えばヒトまたは動物）におけるいずれかの望ましくない細胞を示す。標的細胞は、ヒトLH/hCG受容体を発現しているか過剰発現している細胞であってもよい。ヒトLH/hCG受容体を発現する細胞は、腫瘍細胞、例えば転移性上皮癌、結腸直腸癌、胃癌、口腔癌、膵癌、卵巣癌または腎細胞癌を含み得る。

【0124】

抗体組成物が目的とする標的は、転移癌細胞、例えば転移上皮癌細胞であり、限定するものではないが、細胞表面受容体、成長因子受容体、 α -hCG、LH/hCG受容体（例えば、Burtrum Dら、Cancer Res., 63: 8912-8921, 2003; Luら、J. Biol. Chem. 279: 2856-2865, 2004; Miyamotoら、Clin. Cancer Res. 11: 3494-3502, 2005; Goyaら、Cancer Research 64: 6252-6258, 2004を参照のこと）、抗イディオタイプ抗体を含む抗体、さらに癌、例えば転移癌、転移性上皮癌、結腸直腸癌、胃癌、口腔癌、膵癌、卵巣癌または腎細胞癌に存在する自己抗原が含まれる。他の標的は、接着蛋白質、例えばインテグリン、セレクチンおよび免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。Springer, Nature, 346: 425-433, 1990; Osborn, Cell, 62: 3, 1990; Hynes, Cell, 69: 11, 1992。他の興味ある標的は、成長因子受容体（例えばFGFR、PDGFR、EoF、her/neu、NGFRとVEGF）およびそれらのリガンドである。他の標的はGタンパク質受容体であって、サブスタンスK受容体、アンジオテンシン受容体、 α -および β -アドレナリン受容体、セロトニン受容体とPAF受容体を含む。例えば、Oilman, Ann. Rev. Biochem. 56: 625-649, 1987を参照のこと。他の標的は、イオンチャネル（例えばカルシウム、ナトリウム、カリウムチャネル、多剤耐性を媒介するチャネル蛋白質）、ムスカリン受容体、アセチルコリン受容体、GABA受容体、グルタミン酸受容体とドーパミン受容体（Harpo l d、米国特許第5, 401, 629号明細書および米国特許第5, 436, 128号明細書を参照のこと）を含む。他の標的は、サイトカイン、例えばインターロイキンIL-1~IL-13、腫瘍壊死因子 α および β 、インターフェロン α 、 β および γ 、腫瘍成長因子（TGF- β ）、コロニー刺激因子（CSF）および顆粒球単球コロニー刺激因子（GM-CSF）がある。Aggrawalら、編、Human Cytokines: Handbook for Basic & Clinical Research, Blackwell Scientific, Boston, Mass., 1991を

20

30

40

【0125】

抗ヒト α -hCG抗体の組換え発現

50

- h C G に結合する組換えヒト抗体、例えば、h C G の - L 2 に特異的に結合する抗体は、- h C G が L H / h C G 受容体に結合するのを阻害し、本明細書で提供される教示に基づき、既知技術を用いて本発明に従って提供される。例えば、Ausubelら編 *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, N.Y. (1987, 1992, 1993) ; および Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (これらの開示内容は出典明示により本明細書の一部とされる) を参照のこと。

【 0 1 2 6 】

本発明の抗 h C G 抗体をコードする D N A は、重鎖定常領域 (C_H)、重鎖可変領域 (V_H)、軽鎖可変領域 (V_L) と軽鎖定常領域 (C_L) のうちの少なくとも 1 つをコードするゲノム D N A または c D N A であってよい。ネズミ V 領域の抗原結合部分をコードする D N A の供給源としての染色体遺伝子断片の使用に便利な代替手段は、例えば、Liuら、*Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 84:3439 (1987) および J. *Immunology* 139: 3521 (1987) (これらは出典明示により完全に本明細書の一部とされる) により報告されるように、キメラ免疫グロブリン遺伝子の構築物のための c D N A の使用がある。c D N A の使用は、所望する蛋白質の合成を達成するために、宿主細胞に適した遺伝子発現要素がその遺伝子と組み合わせられることを要求する。c D N A 配列の使用は、適当な R N A スプライシング系がない細菌または他の宿主で c D N A 配列が発現されることができるという点で、ゲノム配列 (イントロンを含) より有利である。

【 0 1 2 7 】

そのようなオリゴヌクレオチドを合成する技術は、周知であり、例えば、Wuら、*Prog. Nucl. Acid. Res. Molec. Biol.* 21:101-141 (1978) および Ausubelら編、*Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience (1987, 1993) により開示されており、その全開示内容は、出典明示により本明細書の一部とされる。

【 0 1 2 8 】

遺伝暗号には縮重があるので、1 つ以上のコドンが特定のアミノ酸をコードするために用いられ得る (Watsonら、以下参照)。遺伝暗号を用いて、1 つまたはそれ以上の異なるオリゴヌクレオチドが認められ得るし、その各々はそのアミノ酸をコードし得る。特定のオリゴヌクレオチドが、現実の抗 - h C G 抗体のコード配列を構成するかという確率は、異常な塩基対形成の関係と、特定のコドンが実際に抗 - h C G 抗体または断片を発現する真核生物もしくは原核細胞で実際に (特定のアミノ酸をコードするために) 用いられる頻度を考慮することにより見積もることができる。そのような「コドン使用頻度規則」は、Latheら、*J. Molec. Biol.* 183:1-12 (1985) により開示されている。この Lathe の「コドン使用頻度規則」を用いれば、抗 - h C G 可変領域または定常領域の配列をコードし得る理論的な「最確の (most probable)」ヌクレオチド配列を含む単一のオリゴヌクレオチドまたは一組のオリゴヌクレオチドが同定される。

【 0 1 2 9 】

時には、あるアミノ酸配列はあるオリゴヌクレオチドのみによりコードされてもよいが、しばしば、そのアミノ酸配列は一組の類似したオリゴヌクレオチドのいずれかによってコードされることがある。重要なことは、この組みのメンバーのは全て、ペプチド断片をコードすることができるオリゴヌクレオチドを含んでおり、したがって、潜在的にペプチド断片をコードする遺伝子と同じオリゴヌクレオチド配列を含むのに対して、その組みの 1 つのメンバーだけがその遺伝子のヌクレオチド配列と同一のヌクレオチド配列を含む。このメンバーはその組みト内に存在し、その組みの他のメンバーの存在下でさえ D N A とハイブリダイズすることができるので、その蛋白質をコードする遺伝子のクローンを作るために単一のオリゴヌクレオチドを用いるのと同じ様式で、分画されていないオリゴヌクレオチドの組みを用いることが可能である。

【 0 1 3 0 】

可変領域または定常領域を含む抗 - h C G 抗体または断片をコードすることができる理論的な「最確の」配列を含むオリゴヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチドの組みは

10

20

30

40

50

、「最確の」配列または配列の組みにハイブリダイズすることができる相補オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの組みの配列を同定するために用いられる。そのような相補的配列を含むオリゴヌクレオチドは、可変領域または定常領域の抗 - h C G 遺伝子を特定して単離するプローブとして用いることができる (Sambrookら、以下参照)。

【 0 1 3 1 】

可変もしくは定常領域の - h C G の断片をコードする適切なオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの組み (あるいは、そのようなオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの組みと相補的である) が特定されて (上記の手順を用いて)、合成され、そして当分野で周知の手段で、抗 - h C G 抗体またはその可変領域もしくは定常領域を発現することができる細胞から誘導された D N A、またはより好ましくは c D N A に対してハイブリダイズさせる。「最確の」可変もしくは定常抗 - h C G 領域ペプチドのコード配列と相補的な一本鎖オリゴヌクレオチド分子は、当業者には周知の手順を用いて合成することができる (Belagajeら、*J. Biol. Chem.* 254: 5765-5780 (1979) ; Maniatisら、*In: Molecular Mechanisms in the Control of Gene Expression*, Nierlichら編、Acad. Press, NY (1976) ; Wuら、*Prog. Nud. Acid Res. Molec. Biol.* 21: 101-141 (1978) ; Khorna, *Science* 203: 614-625 (1979))。加えて、DNA合成は自動合成装置を用いることにより達成され得る。核酸ハイブリダイゼーションの技術は、Sambrookら、(以下参照)により、そしてHayrnesら、(*In: Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985)) (これらの報文は、出典明示により本明細書の一部とされる)。例えば、上記の技術と類似する技術は、ヒトアルデヒド脱水酵素(Hsuら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3771-3775 (1985))、フィブロネクチン(Suzukiら、*Bur. Mol. Biol. Organ. J.* 4: 2519-2524 (1985))、ヒトエストロゲン受容体遺伝子(Walterら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7889-7893 (1985))、組織型プラスミノゲン活性化物質(Pennicaら、*Nature* 301: 214-221 (1983))およびヒト妊娠末期胎盤 (human term placental) アルカリホスファターゼ相補 D N A (Keunら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8715-8719(1985))の遺伝子クローニングの成功を可能にした。

【 0 1 3 2 】

抗 - h C G 抗体の可変領域または定常領域をコードするポリヌクレオチドのクローンを作る別の方法において、発現ベクターのライブラリは、発現ベクターに D N A またはより好ましくは c D N A (抗 - h C G 抗体または可変もしくは定常領域を発現することができる細胞からのもの) をクローニングすることにより調製される。次いで、そのライブラリを、抗 - h C G 抗体 (例えば m A b 2 B 2 . 6 F 5 または 2 B 3 . 3 E 8) の L H / h C G 受容体に対する結合を競争的に阻害し、そして抗 - h C G 抗体またはその断片と同じアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードすることができるヌクレオチド配列を有する蛋白質を発現することができるメンバーについてスクリーニングする。この例では、D N A またはより好ましくは c D N A は、抗 - h C G 抗体または断片を発現することができる細胞から抽出されて、精製される。精製された c D N A は、D N A または c D N A 断片のプールを得るために断片化される (剪断、エンドヌクレアーゼ消化、その他の方法によって)。次いで、このプールからの D N A または c D N A 断片は、発現ベクターのゲノム・ライブラリを得るために、発現ベクターにクローニングされ、そのメンバーは各々、原核細胞 (例えば細菌) または真核生物細胞 (例えば、哺乳動物、酵母、昆虫または真菌) での発現のため、例えばラムダファージ・ライブラリに唯一のクローン化 D N A または c D N A 断片を含む。例えば、Ausubel (以下参照)、Harlow (以下参照)、Colligan (以下参照)、; Nyssonenら、*Bio/Technology* 11: 591-595 (Can 1993) ; Marksら、*Bio/Technology* 11: 1145-1149, 1993を参照のこと。ひとたび、そのような可変もしくは定常領域の抗 - h C G をコードする核酸が単離されると、その核酸は、阻害活性を有する - h C G を結合する組換え m A b を得るために、他の定常もしくは可変部の重鎖または軽鎖をコードする他核酸と共に、宿主細胞で適当に発現させることができる。そのような抗体は、好ましくは、抗原結合に寄与する相補性決定残基を有するフレームワーク残基を含む、ネズミもしくはヒト抗 - h C G 可変領域を含む。好ましい実施形態において、

上記のように核酸によりコードされる抗 - h C G 可変部の軽鎖または重鎖は、配列番号：2、配列番号：4または配列番号：6に記載の、少なくとも5個のアミノ酸のエピトープと結合する。

【0133】

本発明のネズミおよびキメラ抗体の定常(C)領域、断片および領域をコードするヒト遺伝子は、ヒト胎生肝臓ライブラリから既知の方法によって誘導され得る。ヒトC領域遺伝子は、ヒト免疫グロブリンを発現し産生する細胞を含むいずれかのヒト細胞から誘導され得る。ヒトC_H領域は、ヒトH鎖の既知のクラス、または、μ、δ、ε、κ、λ、もしくはαを含むアイソタイプ、またはそのサブタイプ、例えばG₁、G₂、G₃およびG₄のいずれかから誘導され得る。H鎖アイソタイプは、抗体の様々なエフェクター機能の要因となるので、C_H領域の選択は所望のエフェクター機能、例えば補体結合または抗体依存性細胞障害(ADCC)の活性によって導かれる。好ましいC_H領域は、ガンマ1(IgG₁)、ガンマ3(IgG₃)、ガンマ4(IgG₄)またはミュー(IgM)である。

10

【0134】

ヒト抗体および抗体のヒト化

ヒト抗体は、ネズミまたはラット可変領域および/または定常領域を有する抗体に付随する特定の問題を避ける。そのようなネズミまたはラット誘導蛋白質の存在は、抗体の迅速な除去につながり得るし、その抗体に対する患者による免疫応答の産生につながり得る。ネズミまたはラット誘導された抗体の利用を避けるために、ヒト化抗体を開発し、あるいは、げっ歯類が完全なヒト配列を有する抗体を産生するようにげっ歯類中へのヒト抗体機能の導入を通じて完全なヒト抗体を産生し得ることが提唱された。

20

【0135】

YACにおいてメガベース・サイズのヒト遺伝子座をクローン化して再構築し、そしてそれらをマウス生殖細胞系に導入する能力は、それらをマウス生殖細胞系に導入する能力は、非常に大きく未完成の状態での遺伝子座マッピングの機能的な成分を解明するにあたって、ならびに、ヒト疾病の有用なモデルを作製するにあたって強力な手法を提供する。さらに、マウス遺伝子座のそれらのヒトと同等の遺伝子座による置換に関する技術の利用は、その発生段階の発現および調節、その他の系との伝達、および疾患誘導および増悪におけるそれらの関与に対する独自の知見を提供し得る。

【0136】

そのような方策の重要な事実上の適用は、マウス体液性免疫系の「ヒト化」である。内因性のIg遺伝子が不活性化されたマウスへのヒト免疫グロブリン(Ig)遺伝子座の導入は、抗体のプログラムされた発現および組立ての基礎をなす機序、ならびにB細胞の発生におけるそれらの役割を研究する機会を提供する。さらに、そのような方策は、完全なヒト・モノクローナル抗体(mAb)の産生のための理想的な供給源を提供し、ヒト疾病における抗体療法の将来性を達成する方向に重要な一里塚を築いた。完全なヒト抗体は、マウスまたはマウス誘導化mAbに備わる免疫原およびアレルギー応答を最小化し、かくして投与された抗体の有効性と安全性を増加させることが期待される。完全なヒト抗体の使用は、繰り返しの抗体投与を要求する、慢性および再発性ヒト疾病、例えば炎症、自己免疫および癌の処置で実質的な利点を提供することが期待される。

30

40

【0137】

この目標に対する1つのアプローチは、マウス抗体産生を欠き、ヒトIg遺伝子座の大部分の断片を有するマウス株を作り出すことであり、予想では、そのようなマウスはマウス抗体が存在しない状態で多数のヒト抗体レパートリーを生じる。多数のヒトIg断片は、多数の可変部分遺伝子の多様性、ならびに抗体産生と発現の適当な調節を保存するであろう。抗体の多様化と選択に関するマウス機序、およびヒト蛋白質に対する免疫学的寛容の欠如を利用することによって、これらのマウス株において再産生されたヒト抗体レパートリーは、ヒト抗原を含むいずれかの興味ある抗原に対して高親和性の抗体を産生するであろう。ハイブリドーマ技術を用いることで、所望の特異性を有する抗原特異性ヒトmAbを、容易に生じさせることができ選択できた。

50

【0138】

そのような手法は、1990年1月12日に出願された米国特許出願番号第07/466,008号、1990年11月8日に出願された出願番号第07/610,515号、1992年7月24日に出願された出願番号第07/919,297号、1992年7月30日に出願された出願番号第07/922,649号、1993年3月15日に出願された出願番号第08/031,801号、1993年8月27日に出願された出願番号第08/112,848号、1994年4月28日に出願された出願番号第08/234,145号、1995年1月20日に出願された出願番号第08/376,279号、4月27日に出願された出願番号第08/430,938号、1995年6月5日に出願された出願番号第08/464,584号、1995年6月5日に出願された出願番号第08/464,582号、1995年6月5日に出願された出願番号第08/463,191号、1995年6月5日に出願された出願番号第08/462,837号、1995年6月5日に出願された出願番号第08/486,853号、1995年6月5日に出願された出願番号第08/486,857号、1995年6月5日に出願された出願番号第08/486,859号、1995年6月5日に出願された出願番号第08/462,513号、1996年10月2日に出願された出願番号第08/724,752号、および1996年12月3日に出願された出願番号第08/759,620号にさらに記載され詳述されている。また、Mendezら、Nature Genetics 15: 146-156, 1997およびGreen and Jakobovits, J. Exp. Med. 188: 483-495, 1998を参照のこと。また、1996年6月12日に認可発行された欧州特許番号第EP 0 463 151 B1号、1994年2月3日に発行された国際特許出願WO94/02602号、10月31日に発行された国際特許出願WO96/34096号、および1998年6月11日に発行されたWO98/24893号を参照のこと。以上で引用した特許、特許出願および報文の各開示内容は、その全部を出典明示により本明細書の一部とする。

10

20

30

40

50

【0139】

別の手法では、ジェンファーム・インターナショナル (GenPharm International) 社を含む他のもので、「ミニローカス (minilocus)」法が利用される。ミニローカス法では、外来のIg遺伝子座を、Ig遺伝子座の小片 (個々の遺伝子) 含有物を通じて模倣する。このように、1つまたはそれ以上のV_H遺伝子、1つまたはそれ以上のD_H遺伝子、1つまたはそれ以上のJ_H遺伝子、μ定常領域および第2の定常領域 (好ましくは定常領域) を、動物に挿入するための構築物に形成させる。この手法は、このアプローチは、Surraniらによる米国特許第5,545,807号、およびLonbergとKayによる米国特許第5,545,806号明細書、第5,625,825号明細書、第5,625,126号明細書、第5,633,425号明細書、第5,661,016号明細書、第5,770,429号明細書、第5,789,650号明細書および第5,814,318号明細書、KrimpenfortとBernsによる米国特許第5,591,669号明細書、Bernsらによる米国特許第5,612,205号明細書、第5,721,367号明細書、第5,789,215号明細書、およびChoiとDunnによる米国特許第5,643,763号明細書、およびジェンファーム・インターナショナルの1990年8月29日に提出された米国特許出願番号第07/574748号、1990年8月31日に提出された第07/575962号、1991年12月17日に提出された第07/810279号、1992年3月18日に提出された第07/853408号、1992年6月23日に提出された第07/904068号、1992年12月16日に提出された第07/990860号、1993年4月26日に提出された第08/053131号、1993年7月22日に提出された第08/096762号、1993年11月18日に提出された第08/155301号、1993年12月3日に提出された第08/161739号、1993年12月10日に提出された第08/165699号、1994年3月9日に提出された第08/209741号に記載されている (これらの開示内容は出典明示により本明細書の一部とされる)。また、ヨーロッパ特許番号0 546 073 B1号、国際特許出願WO92/03918号、WO92/22645号、WO92/22647号、WO92/226

70号、WO93/12227号、WO94/00569号、WO94/25585号、WO96/14436号、WO97/13852号、WO98/24884号を参照のこと（これらの開示内容は、その全部を出典明示により本明細書の一部とする）。さらに、Taylorら、1992、Chenら、1993、Tuailonら、1993、Choiら、1993、Lonbergら、1994、Taylorら、1994およびTuailonら、1995、Fishwildら、1996を参照のこと（これらの開示内容は、その全部を出典明示により本明細書の一部とする）。

【0140】

Ig遺伝子座を有するトランスジェニックマウスは、ミニローカス法を用いることにより作製された。ミニローカス法の長所は、Ig遺伝子座の一部を含む構築物を作製でき、動物に導入することを迅速に行える点である。しかしながら、対応するミニローカス法の重大な不利益は、理論的に、少数のV、DおよびJ遺伝子を含めることにより、不十分な多様性を導入する点である。実際、発表された研究は、この懸念を裏づけるようである。ミニローカス法を用いることにより産生された動物のB細胞発生および抗体産生は、阻害されるようである。従って、本発明に関する研究は、より大きな多様性とその動物の免疫レパートリーを再構成する努力を達成するため、大部分のIg遺伝子座を導入する方向に一貫して向かっている。

10

【0141】

ヒト抗マウス抗体(KAMA)応答は、キメラで抗体また別にはヒト化抗体を調製する方に産業を導いた。キメラ抗体はヒト定常領域とネズミ可変領域を有するが、特に抗体の慢性利用または多数用量利用においては、特定のヒト抗キメラ抗体(HACA)応答が観察されると予想される。したがって、HAMAMAまたはHACA応答の懸念および/またはは影響を無視するためにも、-hCGに対する完全なヒト抗体を与えることが望ましい。

20

【0142】

ヒト化および提示技術

ヒト抗体作製と関連して上述したように、低下した免疫原性を有する抗体を産生することに利益がある。ある程度までは、そのことは、ヒト化技術および適切なライブラリを用いている提示技術と関連して達成され得る。ネズミ抗体または他の種からの抗体を、当分野の周知技術を用いてヒト化もしくは霊長類化できることは認められよう。例えば、WinterおよびHarris, Immunol Today 14: 43-46, 1993およびWrightら、Crit. Reviews in Immunol. 12:125-168, 1992を参照のこと。興味ある抗体は、CH1、CH2、CH3、ヒンジ領域および/またはフレームワーク領域に対応するヒト配列と置換する組換えDNA技術により作り出すことができる(WO92/02190号および米国特許番号5,530,101号明細書、第5,585,089号明細書、第5,693,761号明細書、第5,693,792号明細書、第5,714,350号明細書と第5,777,085号明細書を参照のこと)。キメラ免疫グロブリン遺伝子の構築のためのIgcDNAの使用もまた、当分野で知られている(Liuら、PNAS USA 84: 3439, 1987およびJ. Immunol. 139: 3521, 1987)。mRNAは、抗体を産生するハイブリドーマまたは他の細胞から単離されて、cDNAを産生するために用いられる。興味あるcDNAは、特異的なプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応法により増幅することができる(米国特許第4,683,195号明細書および第4,683,202号明細書)。別には、ライブラリを作製し、興味ある配列を単離するためにスクリーニングする。次いで、抗体の可変領域をコードするDNA配列は、ヒト定常領域配列に融合される。ヒト定常領域遺伝子の配列は、Kabatら、(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH publication no. 91-3242において見い出すことができる。ヒトC領域遺伝子は、既知のクローンから容易に入手できる。アイソタイプの選択は、所望のエフェクター機能、例えば、補体結合または抗体依存性細胞障害の活性により誘導される。好ましいアイソタイプは、IgG₁、IgG₂、IgG₃およびIgG₄である。本発明の抗体に特に好ましいアイソタイプは、IgG₂とIgG₄である。ヒト軽鎖定常領域、カッパまたはラムダのいずれも用いることができる。次いで、キメラ、ヒト化抗体は、従来法により発現される。

30

40

【0143】

50

抗体断片、例えばFv、F(ab')₂およびFabは、無傷の蛋白質の開裂によって、例えば蛋白質分解酵素または化学的開裂により調製することができる。別には、切断された遺伝子が設計される。例えば、F(ab')₂断片の一部をコードするキメラ遺伝子は、H鎖のCH1ドメインとヒンジ領域、続いて切断された分子を産生するための翻訳終止コドンを含む。

【0144】

1つのアプローチにおいて、重鎖および軽鎖J領域をコードする共通配列は、V領域部分を後ろのヒトC領域部分に連結するにあたって、有用な制限部位をJ領域に導入するプライマーとして使用するための、オリゴヌクレオチドを設計するために用いることができる。C領域cDNAを部位特異的突然変異導入によってモディファイし、ヒト配列の類似位置に制限部位を配置することができる。

10

【0145】

発現ベクターは、プラスミド、レトロウイルス、コスミド、YAC、EBV誘導エピソーム、その他の類似物を含む。便利なベクターは、機能的に完全なヒトC_HまたはC_L免疫グロブリン配列をコードし、V_HまたはV_L配列のいずれかを容易に挿入し発現させることができるよう作られた適当な制限部位を有するベクターである。そのようなベクターにおいて、スプライシングは通常、挿入されたJ領域のスプライス供与部位とヒトC領域の前のスプライス受容部位との間で、また、ヒトC_Hエキソン内に生じるスプライス領域で生じる。ポリアデニル化と転写終結は、コード領域の下流の天然の染色体部位で生じる。結果として得られるキメラ抗体は、レトロウイルスLTR、例えばSV-40早期プロモーター (Okayamaら、Mol. Cell. Bio. 3: 280, 1983)、ラウス肉腫ウイルスLTR (Gormanら、P.N.A.S. 79: 6777, 1982) およびモロニー・マウス白血病ウイルスLTR (Grosschedlら、Cell 41: 885, 1985); ネイティブ1gプロモーターなどを含む、いずれかの強力なプロモーターと連結されてよい。

20

【0146】

さらに、ヒト抗体または他の種由来の抗体は、限定するものではないが、ファージ・ディスプレイ、レトロウイルス・ディスプレイ、リボソーム・ディスプレイおよび当分野で周知の技術を用いた他の技術を含む提示 (ディスプレイ) 形式の技術を通じて作製することができ、その結果得られた分子は、さらなる成熟、例えば親和性成熟などの当分野で周知の技術を受けてもよい。WrightおよびHarris, 上掲, HanesおよびPluchau, PNAS USA 94: 4937-4942, 1997 (リボソーマル・ディスプレイ)、ParmleyおよびSmith, Gene 73: 305-318, 1988 (ファージ・ディスプレイ)、Scott, TIBS 17: 241-245, 1992、Cwirlaら、PNAS USA 87: 6378-6382, 1990、Russellら、Nucl. Acids Research 21: 1081-1085, 1993、Hoganboomら、Immunol. Reviews 130: 43-68, 1992、ChiswellおよびMcCafferty, TIBTECH 10: 80-84, 1992、ならびに米国特許第5,733,743号明細書。ディスプレイ技術がヒト以外の抗体を産生するために用いられても、そのような抗体は上述のようにヒト化することができる。

30

【0147】

これらの技術を用い、抗体は、 μ -hCG発現細胞、 λ -hCG、hCG、またはhCG、そのエピトープもしくはペプチドの形態、および発現ライブラリに対して産生することができ (例えば米国特許第5,703,057号を参照のこと)、次いで、上述のように活性に関してスクリーニングすることができる。

40

【0148】

他の治療法の設計および作成

本発明に従い、そして、本明細書中で産生され特徴づけられた抗体、例えば、 μ -hCGに対する抗体または特異的にhCGの μ -L2ループと結合する抗体の活性に基づき、他の抗体、他の拮抗剤または抗体以外の化学部分を含む他の治療形態の設計は容易になされる。そのような形態には、類似の結合活性または機能を有する抗体、例えば二重特異性抗体、免疫毒素および放射性同位元素で識別された療法、ペプチド療法、遺伝子療法、特に細胞内発現抗体 (intrabody)、アンチセンス療法および小分子の生成を含むが、これ

50

に限定されるものではない。さらにまた、上記のように、本発明の抗体のエフェクター機能が、様々な治療上の使用のため、アイソタイプ転換によってIgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgD、IgA、IgEまたはIgMに変えられてもよい。

【0149】

高度な抗体療法の生成と関連して、補体結合が望ましい特性である場合、例えば、二重特異性、免疫毒素または放射標識の使用を通じて、細胞致死に関する補体の依存を回避することは可能であり得る。

【0150】

二重特異性抗体に関して、二重特異性抗体は、(i) 2個の抗体、1つは -hCGに特異性を有するもので、もう1つは第二の分子に対するもので、それらが互いに結合されたもの、(ii) 単一の抗体であって、一方の鎖は -hCGに対する特異性を有し、第二の鎖は第二の分子に対する特異性を有するもの、あるいは(iii) 一本鎖抗体であって、-hCGと他の分子に対する特異性を有するものを含み、作製することができる。そのような二重特異性抗体は、周知の技術を用いて生成することができ、例えば、(i) および(ii) に関するものとしては、例えば、Fangerら、Immunol Methods 4: 72-81, 1994ならびにWrightおよびHarris, 上掲、を参照のこと、また(iii) に関しては、例えば、Trauneckerら、Int. J. Cancer 7: 51-52, 1992を参照のこと。

10

【0151】

加えて、「カッパボディ(Kappabodies)」(Illら、Protein Eng 10: 949-57, 1997)、「ミニボディ(Minibodies)」(Martinら、EMBO J. 13: 5303-9, 1994)、「ディアボディ(Diabodies)」(Holligerら、PNAS USA 90: 6444-6448, 1993)または「ヤヌシン(Janusins)」(Trauneckerら、EMBO J 10: 3655-3659, 1991)およびTrauneckerら、Int J Cancer 7:51-52, 1992)もまた調製することができる。

20

【0152】

免疫毒素と関連して、抗体は、当分野で周知の技術を利用して、免疫毒素として作用させるためにモディファイすることができる。例えば、Vitetta, Immunol Today 14: 252, 1993を参照のこと。また、米国特許第5,194,594号明細書を参照のこと。放射性同位元素で識別された抗体の調製と関連して、そのようなモディファイされた抗体は、当分野で周知の技術を利用して、容易に調製することができる。例えば、Junghansら、Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (第2版、ChafierおよびLongo編、Lippincott Raven, 1996)を参照のこと。また、米国特許第4,681,581号明細書、第4,735,210号明細書、第5,101,827号明細書、第5,102,990号明細書(RE35,500)、第5,648,471号明細書、第5,697,902号明細書を参照のこと。免疫毒素および放射性同位元素で識別された分子のそれぞれは、-hCGを発現する細胞、特に本発明の抗体が効果的な細胞を殺害するであろう。

30

【0153】

-hCGおよびそれに対する抗体、例えば、本発明の抗体に関する構造上の情報の利用(小分子と関連して後述するように)、またはペプチドライブラリーのスクリーニングを通じた治療ペプチドの生成に関し、治療ペプチドは、-hCGに対するものとして生成し得る。ペプチド治療の設計およびスクリーニングは、Houghtenら、Biotechniques 13: 412-421, 1992、Houghten PNAS USA 82: 5131-5135, 1985、Pinallaら、Biotechniques 13: 901-905, 1992、Blake およびLitzi-Davis, BioConjugate Chem. 3: 510-513, 1992に関連して議論される。免疫毒素および放射性同位元素で識別された分子は、抗体に関連して上述のように、ペプチド模倣体に関して同様の方法で、調製することができる。

40

【0154】

抗原に対する抗体の結合に関する重要な情報は、ファージ・ディスプレイ実験を通して集めることができる。そのような実験は、ランダム・ペプチドを発現するファージライブラリーで、結合するペプチドを単離できるかを決定するため、本発明の抗体との結合についてパニングすることを通じて、通常、達成される。成功した場合、特定のエピトープ情報を、結合したペプチドから得ることができる。

50

【0155】

一般に、ランダムなペプチドを発現しているファージライブラリーは、バクテリオファージM13系に基づき、ニューイングランド・バイオラボ(7マーおよび12マーのライブラリー、Ph.D.7ペプチド7マー・ライブラリキットおよびPh.D.12ペプチド12マーライブラリキット、それぞれ)から購入することができる。7マーのライブラリーは、約 2.0×10^9 の独立したクローンの多様性を示し、全部ではないが、 $20^7 = 1.28 \times 10^9$ の可能な7マー配列の大部分を表す。12マーのライブラリーは、約 1.9×10^9 の独立したクローンを含み、可能な配列空間、 $20^{12} = 4.1 \times 10^{15}$ の12マー配列のごく一部の試料のみを示す。7マーおよび12マーのライブラリーのそれぞれは、プレートを適当な抗体を補足するための抗体で被覆し(例えば、IgG抗体のためのヤギ抗ヒトIgG抗体Fc)、続いて、洗浄するという製造業者の指示に従って、パニングまたはスクリーニングを行う。結合したファージを、0.2Mのグリシン-HCl、pH2.2で溶出する。一定のストリンジェントな条件(0.5% Tween)で、3ラウンドの選択/増幅の後、DNA配列決定を用いることにより、抗体の1つまたはそれ以上と反応性のある、ライブラリー由来のクローンの特徴づけることができる。ペプチドの反応性は、ELISAにより決定することができる。ペプチドのエピトープ分析のさらなる議論については、ScottおよびSmith, Science 249: 386-390, 1990; Cwirllaら、PNAS USA 87: 6378-6382, 1990; Feliciら、J. Mol. Biol. 222: 301-310, 1991、およびKuwabaraら、Nature Biotechnology 15: 74-78, 1997もまた参照のこと。

10

【0156】

従来技術を通じた遺伝子治療および/またはアンチセンス治療法は、本発明を通じて容易になされる。そのような形態は、hCGの機能をモジュレートするために利用することができる。それと関連して、本発明の抗体はそれに関連する機能的アッセイの設計および使用を容易にする。アンチセンス治療の設計および方策は、国際特許出願第94/29444号で詳細に記載されている。遺伝子治療の設計および方策は、周知である。しかしながら、特に、イントラボディに關係する遺伝子治療技術の使用は、特に利益があることが示された。例えば、Chenら、Human Gene Therapy 5: 595-601, 1994およびMarasco, Gene Therapy 4: 11-15, 1997を参照のこと。遺伝子治療に関する一般的な設計および要点は、国際特許出願第97/38137号にもまた記載されている。本発明の抗体(例えば、mAb 2B2.6F5または2B3.3E8もしくは類似物)をコードする遺伝物質は、適切な発現系(ウイルス、減弱ウイルス、非ウイルス、裸ウイルスもしくは他のもののいずれか)に含ませ、宿主内での抗体のインビボ産生のため宿主に投与することができる。

20

30

【0157】

小分子治療もまた、本発明に関して想定され得る。薬物は、本発明に基づくhCGの活性をモジュレートするよう設計することができる。hCG分子構造、そして本発明に關係する他の分子、例えば、本発明の抗体、LH/hCG受容体およびその他の分子との相互作用から収集される知識は、理性的にさらなる治療形態を設計するために利用されてもよい。この点に関しては、X線結晶学、コンピュータ支援(または補助)分子モデリング(CAMM)、定量もしくは定性的な構造活性相関(QSAR)、および類似技術などの合理的な薬物設計技術は、創薬効果に着目して利用することができる。論理的設計は、分子またはその特定の型と相互作用でき、そして、hCGの活性をモディファイもしくはモジュレートするために用い得る、蛋白質または合成構造の予測を可能にする。そのような構造は、化学的に合成されてもよいし、生物系で発現されてもよい。これらのアプローチは、Capseyら、Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs (Stockton Press, NY, 1988)にて報告されている。実際、他の分子(例えば、本発明の抗体)との、既知もしくは詳細に報告された構造活性相関に基づく、分子(ペプチド、ペプチド模倣体、小分子、またはその類似物のいずれか)の論理的な設計は、一般に日常的操作となった。例えば、Fryら、Proc Natl Acad Sci USA 95: 12022-7, 1998; Hoffmanら、J Mol Biol 282: 195-208, 1998; Ginalskaら、Acta Biochim Pol 44: 557-64, 1997; Joukoら、Biochem J

40

50

322: 927-35, 1997 ; Singhら、J Med Chem 40: 1130-5, 1997 ; Mandelら、Nat Biotechnol 14: 323-8, 1996 ; Monfardiniら、Proc Assoc Am Physicians 108: 420-31, 1996 ; Furetら、J Comput Aided Mol Des 9: 465-72, 1995を参照のこと。

【 0 1 5 8 】

さらに、組み合わせライブラリは、設計し、合成することができ、ハイスループット・スクリーニング効果などのスクリーニング計画を用いることができる。

【 0 1 5 9 】

トランスジェニックマウスにおける抗体の調製

本発明に関する抗体は、ヒト抗体の実質的な部分を有し、挿入されたゲノムを生じるが、内因性の、ネズミ抗体の産生に欠陥が生じたトランスジェニックマウスの利用を通じて、好ましくは調製される。このように、そのようなマウスは、ヒト免疫グロブリン分子および抗体を産生することができるが、ネズミ免疫グロブリン分子および抗体の産生は欠損している。しかしながら、特にマウスと抗体の遺伝子組換えによる産生の好ましい実施形態は、1996年12月3日に出願された米国特許出願番号第08/759620号に開示されており、その開示内容は出典明示により本明細書の一部とされる。また、Mendezら、Nature Genetics 15: 146-156, 1997を参照のこと（その開示内容は出典明示により本明細書の一部とされる）。

【 0 1 6 0 】

そのような技術を用いることにより、我々は種々の抗原に対する完全なヒト・モノクローナル抗体を産生した。本質的には、我々は興味ある抗原でマウス系を免疫し、抗体を発現するマウスからリンパ細胞（例えばB細胞）を回収し、回収された細胞を骨髄系の細胞系統と融合させ、無限増殖するハイブリドーマ細胞系を調製し、そして該ハイブリドーマ細胞系をスクリーニングして、興味ある抗原に特異的な抗体を生じるハイブリドーマ細胞系を特定して選択する。我々は、 λ -hCGに特異的な抗体の調製のために、本発明に従ってこれらの技術を利用した。本明細書中で、我々は λ -hCGに特異的な抗体を生じる複数のハイブリドーマ細胞系の産生を記載する。さらに、我々は、該細胞系により産生される抗体の、重鎖および軽鎖のヌクレオチドとアミノ酸配列分析を含む特徴を提供する。

【 0 1 6 1 】

本明細書中で述べられるように、mAb 2B2.6F5および2B3.3E8に関するハイブリドーマ細胞系から誘導される抗体が発現された。上述の細胞系により産生される抗体のそれぞれは、いずれも完全なヒトIgG1重鎖およびヒトIgG1軽鎖である。一般に、本発明に関する抗体は、非常に高い結合性を有し、典型的には、固相または液相のいずれかにより測定されたKdは約 10^{-9} M ~ 10^{-11} Mを有する。

【 0 1 6 2 】

認められるように、本発明に関する抗体は、ハイブリドーマ細胞系以外の細胞系で発現されてもよい。特定の抗体のcDNAまたはゲノム・クローンをコードする配列は、適切な哺乳動物または非哺乳類宿主細胞の形質転換に用いることができる。形質転換は、ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するいずれかの既知方法、例えば、ポリヌクレオチドをウイルス（またはウイルス・ベクターに）に被包し、そのウイルス（またはベクター）を、宿主細胞に形質導入する方法、あるいは当分野で既知のトランスフェクション手順による方法によるものであってよく、米国特許第4,399,216号明細書、第4,912,040号明細書、第4,740,461号明細書および第4,959,455号明細書により例証される（いずれの特許も、出典明示により本明細書の一部とされる）。形質転換手順は、形質転換に用いられる宿主に依存する。哺乳動物細胞への異種ポリヌクレオチドの導入方法は、当分野で周知であり、限定するものではないが、デキストラン媒介型トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリプレックス媒介型トランスフェクション、プロトプラストの融合、電気穿孔法、微粒子銃、リポソームのポリヌクレオチド（類）の被包、ペプチド・結合体、デンドリマーおよび核へのDNAの直接のマイクロインジェクションが含まれる。

【 0 1 6 3 】

発現のため宿主として利用可能な哺乳動物細胞系は、当分野で周知であり、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）入手可能な多くの不死化細胞系が含まれ、限定するものではないが、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、NSO、HeLa細胞、乳児ハムスター腎臓（BHK）細胞、サル腎培養細胞（COS）、ヒト肝細胞癌細胞（例えばHep G2）と多くの他の細胞系が挙げられる。細菌、酵母、昆虫および植物を含むがこれに限定されない哺乳動物以外の細胞もまた、組換え抗体を発現させるために用いることができる。糖鎖形成を除去する抗体CH2ドメインの部位特異的突然変異導入は、ヒト以外の糖鎖形成の結果生じる免疫原性、薬物動態学および/またはエフェクター機能のいずれかの変化を防ぐために好ましい。発現方法は、どの系が最も高い発現レベルを産生するか、また構成要素の - hCG 結合特性を有する抗体を産生するか決定することによって選択される。

10

【0164】

さらに、本発明の抗体（またはその他の部分）の産生細胞系による発現は、多くの既知の技術を用いて向上させることができる。例えば、グルタミン合成酵素およびDHFR遺伝子発現系は、特定の条件下で発現を向上させるための共通のアプローチである。高発現細胞クローンは、従来技術、例えば限界希釈クローニングおよびマイクロドロップ技術を用いて確認することができる。GSシステムは、ヨーロッパ特許第0216846号明細書、第0256055号明細書および第0323997号明細書、そしてヨーロッパ特許出願第89303964.4号の全体または関連部分で議論されている。

20

【0165】

本発明の抗体は、興味ある免疫グロブリンの重鎖および軽鎖配列に関する遺伝子組換え動物または植物の作製を通じて、また回収可能な形態での抗体産生を通じ、遺伝子組換え的に産生され得る。哺乳動物の遺伝子組換え産生と関連して、抗体はヤギ、ウシまたは他の哺乳動物の乳に産生させ回収することができる。例えば、米国特許第5,827,690号明細書、第5,756,687号明細書、第5,750,172号明細書および第5,741,957号明細書を参照のこと。

【0166】

本発明に係る抗体の機能分析に関連して、該抗体が、 - hCG およびその LH / hCG 受容体に対する結合の強力な阻害剤であると判明した。例えば、本発明に係る抗体、例えば mAb 2B2 . 6F5 と 2B3 . 3E8 が - hCG と結合して、hCG の LH / hCG 受容体への結合を阻害することが実際に示された。図6および7を参照のこと。例えば、本発明に係る抗体、例えば mAb 2B2 . 6F5 および 2B3 . 3E8 が、(i) BXP C - 3 膵癌細胞のインビトロでの増殖を阻害すること；および (ii) MCF - 7 乳癌細胞または HeLa 細胞のインビトロでの増殖を阻害しないことが示された。

30

【0167】

本発明に従って実際に示された結果は、本発明の抗体が、腫瘍疾患の処置のための - hCG に対する現在の治療抗体より本抗体が高い効能があり得るという特定の特性を有することを示す。

【0168】

特に、本発明の抗体 mAb 2B2 . 6F5 または 2B3 . 3E8 は、非常に望ましい特性を所有する。これらの構造上の特徴、機能または活性は、上記のようにさらなる抗体または他の分子の設計または選択を容易にする基礎を与える。

40

【0169】

処置療法

本発明は、1つの抗体または抗体の組み合わせ、例えば - hCG に対する抗体（モノクローナル、ポリクローナルまたは一本鎖 Fv；無傷の抗体またはその結合断片）を含み、医薬上許容される担体と共に処方される医薬組成物を提供する。いくつかの組成物は、複数（例えば2個またはそれ以上）の本発明のモノクローナル抗体または抗原結合部分の組み合わせを含む。いくつかの組成物において、組成物中の抗体またはその抗原結合部分の各々は、抗原の異なる予め選択されたエピトープに結合するモノクローナル抗体またはヒ

50

ト配列抗体である。

【0170】

予防適用において、医薬組成物または医薬は、疾病または病態（すなわち腫瘍疾患）に罹患し易いかもしくは特に危険性のある患者に、その疾病の進行の間に示される疾病の症状、その合併症および中間の病理学的表現型の生化学、組織学的および/または、行動的の症状を含む危険性を除去もしくは低下させる、重症度を小さくする、あるいは疾病の発症を遅延せるのに十分な量で投与される。治療上の適用において、組成物または薬剤は、該疾病に罹患している疑いのあるまたは既に罹患している患者に、疾病の進行における合併症および中間の病理学的表現型を含む（生化学的、組織学的および/または行動学的）疾病の症状を治癒するのに、または少なくとも部分的に抑止するのに十分な量で投与される。治療的もしくは予防的処置を達成するのに十分な量は、治療上または予防上の有効量と定義される。予防的および治療的療法において、十分な免疫応答が達成されるまで、試薬は通常いくつかの投薬量で投与される。典型的には、免疫応答は監視され、免疫応答が弱まり始めると、反復投薬を行う。

10

【0171】

有効な投薬

本明細書中で記載される癌関連の病態および疾病（例えば転移癌）の処置のための本発明の抗体組成物（例えば - hCG に対する抗体）の有効量は、多種多様な要素、投与方法、標的部、患者の生理的状态、その患者がヒトであるかもしくは、動物であるか、他に医薬が投与されるか、そして処置は予防的なものが治療的なものかどうかに応じて変化する。通常、患者はヒトであるが、トランスジェニック哺乳動物を含むヒト以外の哺乳動物もまた処置し得る。処置投薬量は、安全性および有効性を最適化するために滴定される必要がある。

20

【0172】

抗体を用いた投与に関して、その投薬量は、約 0.0001 ~ 100 mg / 宿主体重 kg、より一般的には 0.01 ~ 5 mg / 宿主体重 kg の範囲にある。例えば、投薬量は、1 mg / 体重 kg、または 10 mg / 体重 kg、または 1 ~ 10 mg / kg の範囲であり得る。例示的な処置療法は、2 週ごとに一回、1 ヶ月に一回、3 ~ 6 ヶ月毎に一回の投与を必要とする。いくつかの方法では、異なる結合特異性を有する 2 個またはそれ以上のモノクローナル抗体が同時に投与され、この場合、投与される各抗体の投薬量は所定の範囲である。抗体は通常複数回投与される。一回の投薬量の間隔が、毎週、毎月または毎年があってもよい。間隔は、患者における抗体の血中レベルを測定することにより示されて不規則となってもよい。いくつかの方法では、投薬量は、1 - 1000 μg / ml の血漿抗体濃度、いくつかの方法では 25 - 300 μg / ml を達成するために調整される。別には、抗体は徐放製剤として投与されてもよく、この場合あまり頻繁でない投与が要求とされる。投薬量と頻度は、患者における抗体の半減期によって変化する。一般に、ヒト抗体が最も長い半減期を示し、次にはヒト化抗体、キメラ抗体およびヒト以外の抗体が続く。投与の投薬量と頻度は、処置が予防的であるか治療的であるかに応じて変化する。予防的適用においては、比較的低投薬量で、長期間にわたって比較的低頻度に投与される。一部の患者は、一生の残りの期間中処置を受け続ける。治療的適用においては、比較的短い間隔での比較的高い投薬量が、時には、病気の進行が低下されか停止するまで、好ましくは患者が疾病の症状の部分的なもしくは完全な改善を示すまで要求される。その後、患者は予防的療法を施されてもよい。

30

40

【0173】

免疫原をコードする核酸の用量は、患者につき 10 ng ~ 1 g、100 ng ~ 100 mg、1 μg ~ 10 mg または 30 μg ~ 300 μg の DNA の範囲にある。感染性ウイルスベクターの用量は、用量につき 10 個 ~ 100 個またはそれ以上のウイルス粒子で変わる。

【0174】

投与経路

50

癌関連の病態および疾病、例えば転移癌の処置のための免疫応答を誘導するための抗体組成物、例えば - h C G に対する抗体は、脳病変および / または治療上の処置を標的とする抗体調製についての吸入剤として予防のため、非経口、局所、静脈内、経口、皮下、動脈内、頭蓋内、腹腔内、鼻腔内、筋肉内手段によって投与されてもよい。他の経路が同じように効果的であっても、免疫原作用剤の最も典型的な投与経路は皮下である。次に最も一般的な経路は、筋肉内注射である。この種の注射は、最も典型的には腕または脚の筋肉で実施される。いくつかの方法では、試薬は直接、堆積物が蓄積される特定の組織に注射される（例えば頭蓋内注射）。静脈注入に関する筋肉内注射は、抗体の投与に関して好ましい。いくつかの方法では、特定の治療抗体は、直接頭蓋に注射される。いくつかの方法では、抗体は、徐放組成物または装置（例えばメディパッド装置（登録商標））として投与される。

10

【 0 1 7 5 】

本発明の試薬は、様々な癌関連の疾病を含む様々な疾病を処置するにあたって、少なくとも部分的な効果を有する他の試薬と組み合わせて選択的に投与してもよい。脳への腫瘍転移の場合、本発明の試薬は、脳血液関門（B B B）を越える本発明の試薬の通過を増加させる他の試薬と共に投与されてもよい。

【 0 1 7 6 】

製剤

免疫応答を誘導するための抗体組成物、癌関連の状態および疾病、例えば転移性癌の処置のための - h C G に対する抗体は、すなわち活性治療薬および様々な他の医薬上許容される成分を含む医薬品組成物としてしばしば投与される。（Remington's Pharmaceutical Science, 第 1 5 版、Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980を参照のこと）。好ましい形態は、投与と医療適用の意図する方法に依存する。組成物はまた、望まれる製剤によって、医薬的に許容できる、無毒な担体または希釈剤を含ませることもでき、それは動物もしくはヒト投与のための医薬組成物を製剤化するために通常用いられる賦形剤と定義される。希釈剤は、組み合わせる物質の生物活性に影響を及ぼさないよう選択される。そのような希釈剤の例には、蒸留水、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液およびハंक溶液がある。加えて、医薬組成物または製剤は、他の担体、アジュバントまたは無毒性、非治療性、非免疫原性の安定剤およびその類似物を含んでもよい。

20

30

【 0 1 7 7 】

医薬組成物は、大きな、ゆっくり代謝される巨大分子、例えば蛋白質、多糖、例えばキトサン、ポリ乳酸、ポリグリコール酸とコポリマー（例えば、ラテックス官能性セファロース、アガロース、セルロースおよびその他の類似物）、重合アミノ酸、アミノ酸コポリマーおよびリピド凝集体（例えば、油滴またはリポソーム）を含むこともできる。加えて、これらの担体は、免疫賦活性作用剤（すなわちアジュバント）として機能し得る。

【 0 1 7 8 】

非経口投与について、本発明の組成物は、無菌の液体、例えば水油、食塩水、グリセロールまたはエタノールであり得る製薬担体と共に、生理的に許容される希釈剤中の物質の溶液または懸濁液の注射可能な投薬量として投与することができる。加えて、補助物質、例えば湿潤剤または乳化剤、界面活性剤、p H 緩衝物質およびその他の類似物は、組成物中に存在してもよい。医薬組成物の他の成分は、石油、動物性油、植物油または合成起源の油、例えば落花生油、大豆油および鉱油である。一般に、特に注射可能な溶剤については、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールのようなグリコールは、好ましい液体担体である。抗体は、活性成分の徐放を可能にする方法で製剤化され得る蓄積注射または埋め込み調剤の形態で投与することができる。典型的な組成物は、H C 1 で p H 6 . 0 に調整された、5 m g / m L のモノクローナル抗体、5 0 m M の L - ヒスチジン、1 5 0 m M の N a C l を含む水性緩衝液で製剤化される。

40

【 0 1 7 9 】

典型的に、組成物は注射可能薬として調製される。液体溶液または懸濁剤のいずれか；

50

注射前に注射剤を調製することもできる、液体ビヒクル中の液剤もしくは懸濁剤のための固体製剤として調製される。製剤は、上記のように、リポソームまたはマイクロ粒子、例えば増強されたアジュバント効果のためのポリ乳酸、ポリグリコリドまたはコポリマーで乳化することもできるしカプセル化することもできる。Langer, *Science* 249: 1527, 1990およびHanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28: 97-119, 1997。本発明の試薬は、活性成分の徐放もしくはパルス放出を可能にする方法で処方され得る蓄積注射または埋め込み調剤の形態で投与することができる。

【0180】

他の投与様式に適したさらなる製剤は、経口、鼻腔内および肺製剤、坐薬および経皮適用を含む。

10

【0181】

坐剤について、結合剤および担体は、例えば、ポリアルキレングリコールまたはトリグリセリドを含み；そのような坐剤は0.5%~10%（望ましくは1%~2%）の範囲で活性成分を含む混合剤から製剤化できる。経口製剤は、賦形剤、例えば医薬等級のマニトール、ラクトース、澱粉、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウム・サッカリン、セルロースおよび炭酸マグネシウムを含む。これらの組成物は、液剤、懸濁剤、錠剤、ピル、カプセル剤、徐放製剤または粉剤の形態をとり、活性成分の10%~95%、好ましくは25%~70%を含む。

【0182】

局所適用は、経皮送達もしくは皮内送達となつてよい。局所投与は、コレラ毒素もしくは解毒された誘導剤またはそのサブユニットまたは他の類似の細菌毒素と共に作用剤を同時投与することにより容易にすることができる。Glennら、*Nature* 391: 851, 1998。同時投与は、混合としてまたは化学架橋によって得られた連結分子としての成分、あるいは融合蛋白質としての発現を用いることにより達成することができる。

20

【0183】

別法として、経皮送達は、皮膚用パッチ剤を用いるか、またはトランスフェロソーム（transferosome）を用いて達成することができる。Paulら、*Eur. J. Immunol.* 25: 3521-24, 1995；Cevcら、*Biochem. Biophys. Acta* 1368: 201-15, 1998。

【0184】

医薬組成物は、通常、無菌で、実質的に等張性があり、そして米食品医薬品局のすべての医薬品製造品質管理基準（GMP）規則に完全に従ったものとして製剤化される。

30

【0185】

診断的使用

診断試薬としての使用のための抗体および抗体組成物の特徴。転移腫瘍細胞、例えば転移性上皮癌、結腸直腸癌、胃癌、口腔癌、膵癌、卵巣癌または腎細胞癌からの細胞を特定する診断法のためのヒト抗体は、好ましくは上記の方法を用いて産生される。この方法は、実質的に無限数の、いずれかのエピトープ結合特異性およびいずれかの所望の抗原に対する非常に強い結合親和力のある、本発明の抗体および抗体組成物を得ることとなる。一般に、その標的に対する抗体のより高い結合親和性、より厳しい洗浄条件は、標的抗原を取り除くことなく非特異的に結合する物質を取り除く免疫測定で実施することができる。したがって、通常、上記アッセイで用いられる本発明の抗体および抗体組成物は、少なくとも 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} または 10^{12} M^{-1} の結合親和力を持つ。さらに、診断試薬として用いられる抗体は、標準的な条件下で平衡に達するまでの十分な時間、少なくとも12時間、望ましくは少なくとも5時間、およびより望ましくは少なくとも1時間を要することが望ましい。

40

【0186】

好ましくは、特許請求する方法に用いられる本発明の抗体および抗体組成物は、高い免疫活性（すなわち、それらがその標的抗原を特異的に結合できるよう、正しく折り畳まれた抗体分子のパーセンテージ）を有する。それは、上記のように大腸菌における抗体をコードする配列の発現によって行われ得る。そのような発現は、通常少なくとも80%、9

50

0%、95%または99%の免疫活性になる。

【0187】

発明のいくつかの方法は、診断試薬として抗体ポリクローナル産物および発明の抗体組成物を用い、そして、他の方法ではモノクローナル単離物を用いる。ポリクローナル混合物の使用には、1つのモノクローナル抗体から成る組成物に関するより多くの利点がある。標的上の複数の部位に結合することにより、ポリクローナル抗体または他のポリペプチドは、単一の部位と結合するモノクローナル体より強い信号（診断法のための）を作り出すことができる。さらに、モノクローナル抗体が元となる配列またはそれと非常に狭い範囲の配列にのみ結合するのに対して、ポリクローナル体は元となる標的配列の多数の異型（例えば対立形質の異型、種異型、株異型、薬物誘導型エスケープ変異型）と結合することができる。しかしながら、モノクローナル抗体は、非常に近い抗原の存在または存在の可能性がある中で単一の抗原を検出のに有利である。

10

【0188】

上記の方法に従って調製されるポリクローナルヒト抗体を用いる方法では、調製物は、典型的には、標的抗原に対し異なるエピトープ特異性を有する抗体の組み合わせを含む。モノクローナル抗体を用いる幾つかの方法では、異なるエピトープ結合特異性を有する2つの抗体があることが望ましい。エピトープ結合特異性の差は、競合アッセイで測定することができる。

【0189】

試料および標的。ヒト抗体はどのような試料の診断試薬としても用い得るが、それらはヒト試料の診断試薬として最も有効である。試料は、患者のいずれかの組織または体液から得ることができる。試料の好ましい供給源は、全血、血漿、精液、唾液、涙、尿、糞便、汗、頬、皮膚および毛が挙げられる。試料は、内部臓器生検から、または癌から得ることもできる。試料は、診断または研究のために臨床患者から得ることができ、また対照として病気に罹患していない個体から、基礎研究のために得ることができる。

20

【0190】

本方法は、いずれかのタイプの標的抗原を検出するのに用いることができる。例示的な腫瘍抗原には、腫瘍抗原、例えば転移性上皮癌、結腸直腸癌、胃癌、口腔癌、膀胱癌、卵巣癌または腎細胞癌の腫瘍抗原がある。他の標的抗原は、その発現レベルまたは組成がヒト疾患または他の表現型と相関するヒト蛋白質である。そのような抗原の例には、接着蛋白質、ホルモン類、成長因子、細胞受容体、自己抗原、自己抗体およびアミロイド沈着物が含まれる。興味のある他の標的は、腫瘍細胞抗原、例えば癌胎児抗原を含む。興味のある他の抗原は、クラスIとクラスIIのMHC抗原である。

30

【0191】

診断アッセイの形式。ヒト抗体は、種々の標準的なアッセイ形式で所定の標的を検出するために用いることができる。そのような形式には、免疫沈降法、ウエスタンブロット法、ELISA、放射免疫測定法および免疫定量（immunometric）アッセイが含まれる。HarlowおよびLane（上掲）；米国特許第3,791,932号明細書；第3,839,153号明細書；第3,850,752号明細書；第3,879,262号明細書；第4,034,074号明細書；第3,791,932号明細書；第3,817,837号明細書；第3,839,153号明細書；第3,850,752号明細書；第3,850,578号明細書；第3,853,987号明細書；第3,867,517号明細書；第3,879,262号明細書；第3,901,654号明細書；第3,935,074号明細書；第3,984,533号明細書；第3,996,345号明細書；第4,034,074号明細書および第4,098,876号明細書（それぞれ、その全部および全ての目的について、出典明示により本明細書の一部とされる）を参照のこと。

40

【0192】

免疫定量アッセイまたはサンドイッチアッセイが好ましい形式である。米国特許第4,376,110号明細書；第4,486,530号明細書；第5,914,241号明細書および第5,965,375号明細書（それぞれ、それぞれ、その全部および全ての目

50

的について、出典明示により本明細書の一部とされる)を参照のこと。そのようなアッセイは、固相に固定された1つの抗体または集団を、および溶液中の1つの抗体または集団が用いられる。典型的には、溶液の抗体もしくは抗体の両方は標識化される。抗体集団を用いる場合、典型的には、その集団は、標的抗原内の異なる特異エピトープに結合する抗体を含む。したがって、同じ集団を、固相と溶液の抗体の双方に用いることができる。モノクローナル抗体を用いる場合、異なる結合特異性のある第1および第2のモノクローナル抗体は、固体と溶液相に用いることができる。固相と液相の抗体は、順にまたは同時に標的抗原と接触できる。固相抗体が最初に接触する場合、そのアッセイはフォワードアッセイと称される。反対に、溶液の抗体が最初に接触する場合、そのアッセイはリバースアッセイと称される。標的が同時に両方の抗体に接触される場合、そのアッセイは同時アッセイと称される。標的を、抗体を用いて接触させた後、試料は通常約10分から約24時間の間で変更して、通常約1時間インキュベートされる。次いで、洗浄工程を、診断試薬として用いる抗体に特異的に結合していない試料成分を取り除くために実施する。固相および溶液の抗体が別の工程で結合される場合、洗浄はいずれかの結合工程または両方の後に実施することができる。典型的には、結合は、洗浄後に標識化された溶液の抗体の結合を通じて固相に連結された標識を検出することによって、定量化される。通常、抗体もしくは抗体集団の所定の対および所定の反応条件に関し、較正曲線は、既知濃度の標的抗原を含む試料から調製される。次いで、試験される試料中の抗原濃度は、較正曲線から当てはめることにより読みとられる。分析物は、平衡状態で結合された標識化された溶液の抗体量から、または、平衡に達するまでの一連の時点の結合された標識化された溶液の抗体の反応速度測定により、測定することができる。その曲線の傾きは、試料中の標的物の濃度の量である。

10

20

30

40

50

【0193】

上記の方法に使用するのに適した支持体は、例えば、ニトロセルロース膜、ナイロン膜および誘導化ナイロン膜、さらには粒子、例えばアガロース、デキストラン系ゲル、ディプスティック(dipstick)、微粒子、マイクロスフェア、磁気粒子、試験管、マイクロタイター・ウェル、セファデックス(SEPHADEX(登録商標))(アマシャム・ファルマシア・バイオテック、ピスカタウェイ(Piscataway)、ニュージャージー州)が含まれる。固定化は、吸着によってか、または共有結合によってであってよい。他には、抗体は、アビジンのような表面に結合させたリンカーに対して結合させためのリンカー分子、例えばビオチンと連結されてもよい。

【0194】

標識

アッセイに用いられる特定の標識または検出可能な群は、アッセイに用いられる抗体の特異的な結合を顕著に干渉しない限り本発明の重要な態様ではない。検出可能な群は、検出可能な物理的もしくは化学的特徴を有するいずれかの物質であってよい。そのような検出可能な標識は、免疫学的検定の分野で広く開発されており、一般に、該方法に有用な標識の大部分は本発明にいずれも適用可能である。従って、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気学的もしくは化学的手法により検出可能ないずれかの組成物である。本発明に有用な標識は、磁気ビーズ(例えば、Dynabeads(登録商標))、蛍光色素(例えば、フルオロセインイソチオシアネート、テキサスレッド、ローダミンおよびその類似物)、放射標識(例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{121}I 、 ^{112}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$)、他のイメージング試薬、例えば超微粒気泡(超音波画像化用)、 ^{18}F 、 ^{11}C 、 ^{15}O (陽電子断層撮影法用)、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In (単一光子放出型断層撮影用)、酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼおよび一般にELISAに用いられる他のもの)および熱量測定標識、例えばコロイド金、または着色ガラスもしくはプラスチック(例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスおよびその類似物)ビーズが挙げられる。そのような標識の使用を記載する特許には、米国特許第3,817,837号明細書;第3,850,752号明細書;第3,939,350号明細書;第3,996,345号明細書;第4,277,437号明細

書；第4，275，149号明細書および第4，366，241号明細書が挙げられ、それぞれは全ての目的に関して、その全部を出典明示により本明細書の一部とされる。また、Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 第6版、Molecular Probes, Inc., Eugene ORを参照のこと。

【0195】

標識は、当分野で周知の方法に従って、アッセイ中の所望の成分と直接的にもしくは間接的に結合させることができる。以上で示すように、多種多様な標識を用いることができ、要求される感度、化合物との抱合化の容易さ、安定性要件、利用できる機器および廃棄規定に応じて標識の選択を行う。

【0196】

非放射性標識は、しばしば間接的な手法で結合される。一般に、リガンド分子（例えば、ビオチン）は、分子に共有結合される。次いで、そのリガンドが、本質的に検出可能な、もしくはシグナル系、例えば、検出可能な酵素、蛍光分子または化学発光分子と共有結合した抗リガンド分子（例えば、ストレプトアビジン）に結合する。多くのリガンドおよび抗リガンドを用いることができる。リガンドが天然の抗リガンド、例えばビオチン、チロキシンおよびコルチゾールを有する場合、それは、標識化された天然の抗リガンドと連結するのに用いることができる。別には、いずれかのハプテンまたは抗原性化合物を、抗体と組み合わせて用いてもよい。

【0197】

該分子もまた、シグナル生成化合物に、例えば、酵素もしくは発光分子と連結することにより直接連結されてもよい。標識として関心のある酵素は、第一に、加水分解酵素、特にホスファターゼ、エステラーゼおよびグリコシダーゼ、または酸化還元酵素、特にペルオキシダーゼであろう。蛍光分子には、フルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロンおよびその類似物が挙げられる。化学発光化合物には、ルシフェリンおよび2，3-ジヒドロフタラジンジオン、例えば、ルミノールが挙げられる。用いることができる標識もしくはシグナル生成系の様々な報文については、米国特許第4，391，904号明細書（すべての目的に関して、その全部を出典明示により本明細書の一部とする）を参照のこと。

【0198】

標識を検出する方法は、当業者には周知である。従って、例えば、標識が放射標識である場合、検出手法には、シンチレーション計数器または放射能写真の感光フィルムが挙げられる。標識が蛍光標識である場合、その蛍光色素に適切な光波長で励起し、その結果得られる蛍光を検出することにより検出することができる。電子感知器、例えば、電荷結合素子（CCD）または光電子増倍管およびその類似物の使用により、視覚的に蛍光を検出できる。同様に、酵素標識は、その酵素に適した基質を提供し、その結果得られる反応生成物を検出することにより、検出することができる。最後に、単純な熱量測定標識は、標識に付随する色を単純に観察することにより検出することができる。かくして、様々な計量アッセイにおいて、様々な連結されたビーズはそのビーズの色を呈するが、連結された金はしばしばピンク色を呈する。

【0199】

幾つかのアッセイ形式では、標識化成分の使用が要求されない。例えば、凝集アッセイは、標的抗体の存在を検出するために用いることができる。この場合、抗原被覆された粒子が、その標的抗体を含む試料により凝集される。この形式では、成分は標識化される必要はなく、標的抗体は単純に視覚観察により検出される。

【0200】

しばしば、 α -hCG蛋白質および β -hCGに対する抗体は、検出可能なシグナルを発する基質と、共有結合もしくは非共有結合のいずれかにより連結されて標識化される。

【0201】

毒性

10

20

30

40

50

好ましくは、治療上有効量の本明細書に記載の抗体組成物は、実質的な毒性を引き起こさず治療上の利益を提供するであろう。

【0202】

本明細書に記載の蛋白質の毒性は、細胞培養分津または実験動物において、一般的な医薬手順により、例えば、LD₅₀（集団の50%致死量）またはLD₁₀₀（集団の100%致死量）を決定することにより、決定することができる。毒性と治療効果との用量比は、治療指標である。細胞培養アッセイおよび動物実験から得られたデータは、ヒトでの使用に関して毒性のない投薬量範囲を計画するのに用いることができる。本明細書に記載の蛋白質の投薬量は、好ましくは、毒性がほとんどないかもしくは毒性のないその有効量を含む循環濃度の範囲内にある。投薬量は、用いられる投与剤型および利用される投与経路に応じてその範囲内で変更され得る。正確な製剤、投与経路および投薬量は、患者の状態に鑑みて個々の医師により選択され得る（例えば、Finglら、1975, In: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1を参照のこと）。

10

【0203】

キット

本発明の範囲内には、本発明の組成物（例えば、モノクローナル抗体、ヒト配列抗体、ヒト抗体、多特異的および二重特異性分子）および使用説明書を含むキットもある。さらに、キットには、少なくとも1つのさらなる試薬、または1つまたはそれ以上のさらなる本発明のヒト抗体（例えば、第一のヒト抗体と異なる抗原のエピトープと結合する、競合活性を有するヒト抗体）を含んでいてもよい。典型的には、キットは、そのキット内容の予定された使用を示すラベルを含む。用語「ラベル」は、いずれかの記述、またはキットにもしくはキットと共に提供される記録用具、その他キットに付随する他のものを含む。

20

【0204】

詳細な説明に記載のおよび以下の実施例に記載の以下のcDNAクローンは、ブダペスト条約のもとアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（American Type Culture Collection）、10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209に寄託された。mAb 2B2.6F5のハイブリドーマ細胞株は、
で示されるATCC受入番号を有する。mAb 2B3.3E8のハイブリドーマ細胞株は、
で示されるATCC受入番号を有する。

30

【0205】

他の実施形態および使用は、本開示内容に照らして、当業者には明らかであろう。

【0206】

実施例1

抗原

モノクローナル抗体の産生のための免疫原は、ペプチドと担体蛋白質の結合体である。ペプチドは、
-hCG L2ロンググループアミノ酸38-57（LP、ループペプチド）に基づいた。担体蛋白質は、ジフテリアトキソイド（DT、Sanofi Aventis、トロント、カナダ）であった。この抗原性製剤の化学名は、Ala-(Proe)-
-hCG(38-57)-Gly[Hyp³⁹]-DT複合体である。
-hCG蛋白質配列の39番目のプロリンが、ヒドロキシプロリンに置換されている。
-hCG(38-57)L
Pのアミノ酸配列は、Ala-Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Cys-Hyp-Thr-Met-Thr-Arg-Val-Leu-Gln-Gly-Val-Leu-Pro-Ala-Leu-Pro-Gln-Val-Val-Cysである。他のいずれかの糖蛋白質シスチンノット成長因子の相同L2ロンググループは、
-hCGの38-57残基に換えて、39番目にヒドロキシプロリン置換を有していても、有していなくてもよい。別の担体蛋白質もまた、この手順に従う。米国特許第6,716,428号明細書を参照のこと。

40

【0207】

ループペプチド（LP）は、ACT合成機で自動化手順を用いた標準的なFmoc合成法と製造元の説明(Advanced ChemTech、ルーイビル、ケンタッキー州)により合成した。

50

ジメチルホルムアミド (DMF)、ジクロロメタン (DCM)、トリフルオロ酢酸 (TFA)、1,2-エタンジチオール (EDT)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (DfiA) およびベンゾトリアゾリルN-オキシ-トリスジメチルアミノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (BOP) は、シグマ社 (セントルイス、ミズーリ州) から得た。Fmoc 保護されたグリシン-p-アルコキシベンジルアルコール樹脂 (Wang resin) は、固体支持体として用いた。これは、DMF と DCM において洗浄することにより調製した。Fmoc-Gly は、DMF 中で 20% ピペリジンを用いて脱保護した。カップリングした後、その樹脂は DMF において洗浄した。Fmoc シス테인、LP 中の次のアミノ酸残基を、BOP の存在下で DIEA を用いてカップリングした。カップリングの効率は、ニンヒドリンを用いて確認した。カップリングが不完全の場合、最大 2 回のさらなるカップリング工程を繰返し行う。脱保護、中和、カップリングおよび洗浄の 27 の標準的なサイクルの完了後、ペプチド樹脂試料を、樹脂からの完了したペプチド混合物の開裂前に、アミノ酸組成について評価した。保護されたペプチド樹脂を、側鎖保護基を取り除くために、p-クレゾール:TFA:EDT:E₂O から成る開裂試薬に 2 時間曝した。このペプチド/樹脂混合物を、焼結ガラス漏斗によりエチルエーテルを用いて連続的に洗浄した。これに続いて、ペプチドを溶解させ、樹脂から分離するために、70% 酢酸で洗浄した。粗ペプチドを、フェリシアン化カリウム (K₃Fe(CN₆)) を用いて 20 時間室温で処理することにより、鎖内のジスルフィド結合の形成を介して結晶化した。環化したペプチドは、Bioresx-70 陽イオン交換樹脂 (バイオ-ラッド、ハーキュリーズ、カルフォルニア州) によるイオン交換クロマトグラフィーにより 70% 酢酸を用いて環化していないペプチドから取り出した。ペプチドのクロマトグラフした貯蔵物を、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP HPLC) により確認し、ペプチド混合物を評価した。ペプチドを、粗結晶化混合物から 2 段階の工程を経て精製した。第一に、低圧逆相クロマトグラフィーを、Q₁ シリカ樹脂において 0.1% トリフルオロ酢酸に加えてアセトニトリル勾配を用いて行った。これに続いて、陰イオン交換クロマトグラフィーを、AG-1x8 陰イオン交換カラム (バイオ-ラッド、ハーキュリーズ、カルフォルニア州) に行い、10% 酢酸を用いて溶出した。純度について、一部の試料を薄層クロマトグラフィーと逆相 HPLC により試験した。適切な純度のペプチド試料の一部を、残存する溶媒を取り除くため凍結乾燥した。ペプチドの一部の乾燥試料を、USP 純水に溶解させ、シェル凍結 (shell frozen) させ、その後凍結乾燥させた。次いで、試料の一部を集め、収量は重量測定により確認した。

【0208】

ジフテリアトキソイド (DT、サノフィ-アベンティス、トロント、カナダ) を、記載の実施例では担体として用いた。しかしながら、当業者には既知であるように、種々の多くの単体蛋白質をこの目的に用いることができる。DT 製造は、コリネバクテリウム・ジフテリア (Corynebacterium diphtheriae) 株 L34T1 培養液のトルエン処理に基づく。この毒素を精製し、透析し、ホルムアルデヒドを用いて解毒し、そして、限外ろ過により濃縮した。硫酸アンモニウム沈殿の後、トキソイドを溶解させ、硫酸アンモニウムを除くため透析した。

【0209】

LP-DT 結合体は、2 種の異なるヘテロ二機能リンカー試薬、N-スクシンイミジル-3 (2-ピリジルチオ) プロピオネート (SPDP、ピアース・ケミカル (Pierce Chemical)、ロックフォード、イリノイ州) および -マレイミドカブロン酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (eMCS、シグマ・アルドリッチ・ファイン・ケミカルズ、セントルイス、ミズーリ州) を用いた 2 つの 2 段階工程により産生した。この工程の結果、DT のリジンアミノ基 (SPDP を介する) のペプチドの N 末端との連結が行われる。精製された DT は、SPDP と反応して、中間体、SPDP-DT を形成する。LP は eMCS と反応して、他の中間体、マレイミド-LP (M-LP) を形成する。次いで、SPDP-DT および M-LP は、互いに反応し、チオエーテル結合を介して LP-DT 結合体を形成する。未反応試薬の除去、中間体の精製、および緩衝液交換は、一連のダイアフ

イルトレーション（膜分離）工程により行った。精製されたDTは、ホウ酸ナトリウム緩衝液、pH 9.2を用いて20 mg/mlに調整した。SPDPを、18モルのペプチドに対して1モルのDTでカップリングさせるため、DTを活性化するのに十分な10 ml/分で添加した。その混合物を室温で1時間攪拌し、その活性型のN-ヒドロキシスクシンイミドエステルを介して、DTのアミノ基に対してSPDPをカップリングさせ、SPDP-DTを生成した。この反応混合液を濃縮し、次いで30倍容量のクエン酸カップリング緩衝液（CCB, pH 6.0）に対するダイアフィルトレーションにより精製した。試料を、pH (6.0 ± 0.2)で、サイズ排除クロマトグラフィーHPLCにより純度を、ロウリー法により濃度を、そして1モルのDTあたり15 - 21モルであることを確認するため、5, 5'-ジチオ-ビス-2-ニトロ安息香酸（エルマン試薬、シグマ・アルドリッチ、セントルイス、ミズーリ州）によりチオール定量を評価した。LPは、1モルのSPDP-DTと反応するM-LP中間体のモル量を生成するのに十分なeMCSのN-ヒドロキシスクシンイミジルエステルと反応させた。M-LPは、スーパーデックス（Sephadex）G10（ファルマシア、ウプサラ、スウェーデン）のカラムにより精製した。マレイミド含量は、エルマン試薬を用いて定量した。SPDP-DTをM-LPと反応させて、LP-DT結合体を生成した。生成したSPDP-DT溶液はCCBを用いて約20 mg/mlに調整した。十分量のM-LPペプチド、CCB中50 mg/mlを1モルのDTあたり18モルのペプチドとカップリングさせるために10 ml/分で加えた。混合物を室温で少なくとも6時間攪拌し、そのC末端のグリシン残基のマレイミドを介してSPDP-DTのチオール部分に対してLPをカップリングさせ、LP-DT結合体を生成した。この結合反応混合物を、次いで、約30 mg/mlに濃縮し、15倍容量のPBS（pH 7.2）に対するダイアフィルトレーションにより精製した。pHを調べた（7.2 ± 0.2）。純度は、SEC HPLCにより確認した。精製したLP-DTは、次いで、滅菌0.22 µmフィルター（ミリポア、ビルリカ、マセチューセッツ州）に通じて濾過し、滅菌PBS（pH 7.2）を用いて最終のバルクLP-DT濃度に調整し、凍結乾燥後保存した。

10

20

30

40

50

【0210】

実施例 2

免疫法

当業者には既知のように、雌C57BL/6マウス（Charles River Laboratories, Wilmington, MA）は、この同系交配マウス株の既知の性質のため、体液性応答反応および-hCGに特異的なハイブリドーマを産生するため免疫処置のために選択した。動物に係する全ての手順は、Institutional Animal CareおよびUse Committeeを参照のこと。マウスは、3つの群で免疫した。免疫処置はすべて、1箇所もしくは2箇所のいずれかの皮下または筋肉内とした。LP-DT複合体は、滅菌水で可溶化し、その後、完全フロインドアジュバント（CFA；シグマ・アルドリッチ、セントルイス、ミズーリ州）または不完全フロインドアジュバント（IFA；シグマ・アルドリッチ、セントルイス、ミズーリ州）のいずれかで完全に乳化させた。CFAは、使用前にボルテックスした。乳化は、水性免疫原溶液とCFAもしくはIFAのいずれかと、ルアーロックにより連結された2個の1 mlガラスの注射器の間で混合し、その混合液が乳白色になり、押すことが困難になるまで混合した。免疫原の終濃度は、1 mlあたり0.5ミリグラムであった。

【0211】

ハイブリドーマ第一世代（融合体1）において、最初の免疫はCFA中0.1 mgのLP-DT結合体を用いた。2箇所にそれぞれ、25ゲージ針（ベクトン・ディッキンソン、フランクリンレイクス、ニュージャージー州）を介して乳化した免疫原0.1ミリリットルを皮下注射した。次の免疫は、IFA中のループ-DT結合体0.05ミリグラムを用いて2週間隔で行い、各回で2箇所に注射した。4回目の免疫後2週間目に、尻尾から採血し、各マウスの血清の結合容量を評価した。マウスを個々に拘束具に移し、尻尾を少しの間また赤外線ランプ下で温めた。アルコールを塗布した後、マウスの尻尾を外科用メスで切開し、血液を数滴得た。血液を1時間37℃でインキュベートした。次いで、各チ

チューブをはじき血液塊を取り出した後、一晚4℃で保存した。チューブを10,000gで回転させ、血清を各チューブから別の容器に移した。血清は、スクリーニング前に-20℃で凍結した。

【0212】

第二実験（融合体2）において、マウスは4週間隔で別々の3つの場所に免疫された。上記のように、最初の免疫はマウスあたり0.1ミリグラムを用いるが、次の免疫はマウスあたり0.5ミリグラムを用いた。最初の手順と他の手順は同じである。

【0213】

実施例3

放射免疫測定法

血清、培養上清、または精製した抗体試料は、10%マウス血清（MS）および1ミリモラーエチレンジアミンテトラ酢酸塩（EDTA）を含むリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に希釈した。スクリーニングを目的とした最初の希釈は、1:10であった。他の試薬は、1%（w/v）ウシ血清アルブミン（BSA）；2.5ng/mlの¹²⁵I hCG；試験前までに高い、中程度および低度の抗体レベルが明らかにしたhCGに特異的な代表的なラビット抗血清を含むアッセイ対照；非特異的なモノクローナル抗体血清；40%ウシ血清（40%CS）を含むPBS-EDTA；および25%（w/v）ポリエチレングリコール（PEG）が含まれる。¹²⁵I hCGは、クロラミンT法により調製した。

【0214】

1%（w/v）ウシ血清アルブミン（BSA）を含む100マイクロリットルのPBSを、4通りで4個の10×75mmの使い捨てガラス管の組みに加えた。次に、2.5ナノグラム/ミリリットルの¹²⁵I hCG100マイクロリットルを、全ての管の組みに、さらに一組の4個の空の管（全計数管として用いる）に分配した。次に、希釈した試料100マイクロリットルを、4通りの管の組みに加えた。管の組みを、陰性対照として非特異的モノクローナル抗体血清と一緒に、そして陽性対照として3つの代表的な抗hCG血清と一緒にインキュベートした。管を穏やかに混合するために攪拌し、プラスチック製のフィンガーラックに置き、そしてパラフィルム、続いてアルミ箔で覆った。おおいをしたプラスチック管のラックを、4℃で16~24時間インキュベートした。次に、管の覆いを外し、それぞれの管に100マイクロリットルのPBS-EDTA-40%CS、続いて400マイクロリットルの25%PEGを加えた。次に、チューブをボルテックスした後、室温で15分間インキュベートした。次に、チューブを4℃で20分間、1500×gで遠心分離した。液体を破棄し、管内に残った放射線活性をガンマ線分光計で少なくとも1管あたり1分間計数した。

【0215】

1分あたりの平均計数は、4通りの各チューブの組みについて計算した。これを、非特異モノクローナル抗体血清を用いたチューブの平均計数を減じて補正した。結合/遊離（B/F）比は、それぞれの希釈物について計算した（全結合数=遊離数）。

【0216】

受容体結合アッセイ。おとなの雄ラットの精巣を皮膜剥離し、2.0mlの注射器の19ゲージ針を用いてPBS中でばらした。分散した物質塊を5分間攪拌し、ナイロンメッシュと脱脂綿に通じて濾過し、次いで、120gで20分間遠心分離した。100ミリグラム蛋白質相当のホモジェネートを、10×75mm管に移した。次に、2.5ナノグラム/ミリリットルの¹²⁵I hCG100マイクロリットルを、全ての組みの管に、さらに1組の4個の空の管（全計数管として用いる）に分配した。次に、100マイクロリットルの希釈した試料を4通りの管の組みに加えた。標準曲線は、5、10、25、50および100ngの未標識hCGを用いて作成した。さらなる管の組みは、濃度を増加させたモノクローナル抗体を用いて調製した。管を穏やかに混合するために攪拌し、プラスチック製のフィンガーラックに置き、そしてパラフィルム、続いてアルミ箔で覆った。覆いをしたプラスチック管のラックを、4℃で16~24時間インキュベートした。次に、

10

20

30

40

50

それぞれの管に100マイクロリットルのPBS-EDTA-40%CS、続いて400マイクロリットルの25%PEGを加えた。次に、チューブをボルテックスした後、室温で15分間インキュベートした。4で20分間、1500×gで遠心分離した後、液体を破棄した。ペレットの放射線活性をガンマ線分光計で少なくとも1管あたり1分間計数した。1分あたりの平均計数は、4通りの各チューブの組みについて計算した。

【0217】

実施例4

細胞系および細胞培養およびハイブリドーマ作製

次の表現型の特徴を有するNS-1ネズミ骨髄腫細胞および3つのヒト細胞系は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)、マナッサス、VAから入手した。第一に、BXPc-3ヒト膵臓癌細胞は、hCG蛋白質を産生するが、hCGヘテロ二量体が結合するLH/hCG受容体には結合しない。第二に、MCF-7ヒト乳癌細胞は対照的に、ほとんどもしくはまったくhCG蛋白質を発現しないが、hCGヘテロ二量体(hCG鎖単独を除く)が結合するLH/hCG受容体を発現する。最後に、HeLaヒト子宮頸癌細胞は、ヒトヘテロ二量体糖蛋白質ファミリーとLH/hCG受容体の共通の鎖の両方を産生する。

【0218】

NS1骨髄腫細胞およびハイブリドーマ細胞は、RPMI-1640(シグマ・アルドリッチ、セントルイス、ミズーリ州)にて培養した。培地には、10%ウシ胎児血清(FBS)、100ユニット/ミリリットルのペニシリン、0.1ミリグラム/ミリリットルのストレプトマイシン、および2mMのL-グルタミンを補充した。融合させ限界希釈サブクロニング後初期のハイブリドーマの培養については、20%FBSを用いた。RPMIもまた、終濃度100ユニット毎ミリリットルのペニシリン;100マイクログラム毎ミリリットルのストレプトマイシンとともに補充した。ハイブリドーマ選択用培地は、10%FBS、ペニシリン、ストレプトマイシン、およびL-グルタミンとともに、最終作用濃度100μMヒポキサチン、0.4μMアミノプテリン、および16μMチミジンを得るため、RPMI1640にハイブリ-マックスHATメディア・サプリメント(Hybri-Max HAT Media Supplement)(シグマ・アルドリッチ・バイオテクノロジー、セントルイス、ミズーリ州)を加えて作製した。BXPc-3およびMCF-7細胞は、10%FBS、ペニシリン-ストレプトマイシンおよびL-グルタミンを補充したRPMI1640にて培養した。HeLa細胞は、10%FBSおよびペニシリン-ストレプトマイシンを補充したDMEMで培養した。細胞培養培地は、メディアテック社(Mediatech, Inc.)(ハーンドン、バージニア州)またはシグマ・アルドリッチ(セントルイス、ミズーリ州)から入手した。

【0219】

細胞培養は、5%CO₂の湿気のある大気下で37にて行った。培養液中の細胞濃度が約10細胞毎ミリリットルに達したら、1:10または1:20希釈を新鮮な培地を用いて行った。細胞凍結は、以下のように行った。良い状態の細胞を素早く分け、滅菌、凍結用遠心管に移し、4で5分間、400gで回転させた。上清を廃棄し、ペレットを最終の細胞濃度約10⁷細胞毎ミリリットルにするのに十分な75%RPMI/20%FBS/5%DMSOを用いて再懸濁した。この懸濁液の一部分0.5mlを氷上で凍結バイアルに分配した。バイアルは凍結用ラック中一晚-70で、次いで、長期保存は液体窒素中で保存した。細胞は、37の水浴中で凍結バイアルを暖めて融解させる。室温でRPMI1640/10%FBSを用いて洗浄した後、細胞を同じ培地10mlで再懸濁し、37で培養した。

【0220】

ハイブリドーマ作製。ポリエチレングリコール1500(PEG1500、Boehringer Mannheim、インディアナポリス、インディアナ州)およびウシ胎児血清(FBS、インビトロジェン/ギブコ(GIBCO)、カールズバッド、カルフォルニア州)は、細胞融合およびハイブリドーマ増殖を助ける能力についてそれぞれ予め篩いにかけた。NS-1

10

20

30

40

50

骨髄腫細胞は、マイコプラズマ試験サービス(Bionique Testing Laboratories、サラナックレーク、ニューヨーク州)を介してマイコプラズマが存在しないことを確認した。

【0221】

マウスは、融合前4日に静脈(尾部)経路を介して、 $0.05 \mu\text{g}$ のLP-DT結合体による抗原ブーストを受けた。これは、Bリンパ球細胞の循環を誘導し、ならびに脾臓へのBリンパ球の移動を促進するものである。細胞融合の日に、 0.5 グラムのPEG 1500を50の水浴で溶解させ、 0.5 ml の無添加のRPMIと合わせ、 37 の水浴で維持した。動物を、頸椎脱臼により犠牲にした。脾臓は無菌的に摘出されて、 37 で 10 ml の無添加のRPMI 1640を含む 100 mm の組織培養プレートに置かれた。ほとんどの細胞が放出されるまで、脾臓を 2.0 ml の注射器の 19 -ゲージ針を使用し、細かい区画に分離した。細胞塊はピペット操作により崩した。細胞と培地は、 50 ml の無菌ポリスチレン遠心管に移した。組織培養プレートを、さらに 10 ml の無添加のRPMI 1640で洗浄し、そして、遠心管の内容物に加えた。3分後に、上清を、沈着した残骸から新しい無菌の 50 ml の遠心管にピペットで移した。こうして得られた脾細胞を、無添加の予熱したRPMI 1640で二回洗浄し、5分間 400 g で遠心分離した。対数増殖期の骨髄腫細胞を、一度、無添加RPMI 1640で洗った。洗われた脾細胞と骨髄腫細胞は、ヌーパウエアー(Neubauer)チャンパー血球計(ライヘルト・サイエンティフィック社(Reichert Scientific Instruments)、パツファロー、ニューヨーク州)を用いて視覚的に計数した。次いで、最大 $1,000,000,000$ 個の脾細胞を $20,000,000$ 個のNS-1骨髄腫細胞と合せ、5分間 400 g で遠心分離した。 37 の 50% PEG 1500溶液を、無菌のパスツール・ピペットを用いて同期した細胞再懸濁液とともに脾細胞-骨髄腫細胞ペレットに、1分かけてゆっくり移した。穏やかに攪拌した1分後に、 10 ml の予熱した無添加のRPMI 1640を、次に2分かけて加えた。細胞を5分間 400 g で遠心分離し、破棄し、そして 20% FBS、ペニシリン-ストレプトマイシン、L-グルタミンおよびHATが補充された 50 ml のRPMI 1640を用いて再懸濁した。細胞を含む 0.5 ml のHAT選択培地を、4枚の24ウェルの組織培養プレートの各ウェルに移した。翌日、細胞に等量の $2 \times$ HAT選択培地を与えた。6日後に、細胞に再び $1 \times$ HAT選択培地を与え、目視できる細胞のコロニーのあるウェルから上清を回収した。さらなる細胞のコロニーが見られたので、断続的に上清の回収を約2週間続けた。実施例3(放射免疫測定法)に記載のように、上清をスクリーニングした。最初のスクリーニングで陽性の上清を含んだウェルを再びスクリーニングした。ヘテロ二量体hCGを結合する再現性が見られたウェルを、培地 10 ml に増量し凍結した。

【0222】

限界希釈法サブクロニング。96ウェルプレートは、 10% のFBS、ペニシリン、ストレプトマイシンおよびL-グルタミンを補充したRPMIを用いて調製した。ハイブリドーマ細胞を計数し、そして20個、10個と2個の細胞/ミリリットルに20ミリリットルの培地を用いて再懸濁した。次いで、各細胞懸濁液を、2つの96ウェルプレート(フィッシャー・サイエンティフィック、オタワ、オンタリオ、カナダ)に、マルチチャンネルピペッター(フィッシャー・サイエンティフィック、オタワ、オンタリオ、カナダ)を用いてウェルあたり 100 マイクロリットルで播種した。6日後に、細胞に同じ培地を与えた。適当なクローン細胞集団を有するウェルを、記載の免疫放射測定法もしくはhCG酵素免疫測定法のいずれかによりスクリーニングした(Rock, E.Pら、Immunogenicity of a fusion protein linking the beta subunit carboxyl terminal peptide (CTP) of human chorionic gonadotropin to the B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LTB).Vaccine. 14: 1560-1568. 1996)。検出は、西洋ワサビペルオキシダーゼ-連結ラビット抗-ヤギIgG重鎖および軽鎖抗体(ベチル・ラボラトリー(Bethyl Laboratories)、モンゴメリー、テキサス州)を介し、次にELISA用の化学発光ペルオキシダーゼ基質(シグマ・アルドリッチ、セントルイス)であった。

【0223】

10

20

30

40

50

アイソタイプの決定、凍結保存およびマイコプラズマ試験。アイソタイプの決定は、固相として96ウェルプレートのウェルあたりプロテインGで精製されたモノクローナル抗体1マイクログラムを用いるELISA形式で製造業者の指示に従い、イムノタイプ。マウスモノクローナル抗体タイピング・キット（シグマケミカル社、セントルイス、ミズーリ州）を用いて個々のモノクローナル抗体について行った。既知アイソタイプのモノクローナル抗体を対照として用いた。凍結保存用の冷凍培地は、75%RPMI、20%FBSおよび5%ジメチルスルホキシド（DMSO）（シグマアルドリッチ、セントルイス、ミズーリ州）を含んだ。凍結保存のため、細胞を4で回転させ、そして、20,000,000細胞/ミリリットルに凍結用培地でゆっくり再懸濁し、凍結用バイアルに分けた。バイアルは、発泡スチロール・ボックスでゆっくり-70まで凍結させ、それから1日後に液体窒素へ移した。マイコプラズマ試験は、バイオニック・テストング。ラボラトリーズ（Bionique Testing Laboratories）（サラナックレーク、ニューヨーク州）により実施した。

10

【0224】

遺伝子配列。細胞質RNAは、バイオテック（セントカサリンズ、オンタリオ州、カナダ）から入手したサイトプラズミック・アンド・ニュークLEAR・RNAピュリフィケーションキット（Cytoplasmic and Nuclear RNA Purification Kit）を用い、製造業者のプロトコルによりハイブリドーマ細胞から得た。全長ポリ（A）RNAは、増幅のためにアンピオン・ファーストチョイス（Ambion FirstChoice）・RLM-RACEキット（アプライド・バイオシステムズ、フォスターシティ、カリフォルニア州）を用い、製造業者のプロトコルにより選択し調製した。3'プライマーは、インビトロジェン（カルズバッド、カリフォルニア州）から入手した。ネステッドPCRを実施し、内部反応はアガロースゲルで行った。正しい予想された断片サイズのバンドを切り出し、ゲル・エクストラクション・キット（Gel Extraction Kit）（キアゲン、バレンシア、カリフォルニア州）を用い、製造業者のプロトコルにより抽出した。汚染するプライマー、ヌクレオチド、DNAポリメラーゼ、油および塩から精製するため、ジーンエリユートPCRクリーンアップ・キット（GenElute PCR Clean-Up Kit）（シグマ・アルドリッチ、セントルイス、ミズーリ州）を用いて実施した。次いで、DNA配列決定は、アプライドバイオシステム（Applied Biosystems）配列決定装置（フォスターシティ、カリフォルニア州）を用い、製造業者のプロトコルにより実施した。

20

30

【0225】

モノクローナル抗体産生および精製。ハイブリドーマ細胞は、1分当たり2回転するコーニング・ポリスチレン・ローラー瓶を用い（フィッシャーサイエンティフィック、オタワ、オンタリオ、カナダ）、10%FBS、ペニシリン、ストレプトマイシンおよびL-グルタミンを含む250mlのRPMIで増殖させた。培養液が1ミリリットルあたり約1,000,000個の細胞の飽和状態に達すると、細胞を遠心により取り除いた。抗体を硫酸沈殿により濃縮し、次に再懸濁し、そして20ミリのリン酸ナトリウム（pH7.0）に4で一晩透析した。後の抗体精製は、ハイ・トラップ（Hi-Trap）プロテインGカラム（GEヘルスケア/アマシャム・バイオサイエンス、ウプサラ、スウェーデン）を用い、製造業者プロトコルにより実施した。カラムからの溶出は、0.1モールのグリシン-HCl（pH2.7）であった。溶出に続いて、溶出液は、次にpH7.0まで1.0モールのトリスを用いて緩衝し、12,000の分子量分離管を用いてリン酸緩衝食塩水（PBS）に4で一晩透析した。抗体は、4で保存するか、または50%グリセロールを含むPBSもしくは水中のいずれかで凍結した。

40

【0226】

実施例5

癌細胞増殖および異種移植片

癌細胞増殖に対する効果は、以下のように評価した。96ウェルプレートに、ウェルあたり培地中 10^3 個の細胞を播種した。2もしくは20マイクログラムの精製モノクローナル抗体を、各ウェルに加えた。ネズミ・モノクローナル抗体（マウスモノクローナル（

50

muromonab) - C D 3 (O K T 3 ; Orthoclone OKT3, Ortho Biotech Products, L.P., プリッジウォーター、ニュージャージー州) を陰性対照として用いた。細胞は、2つの方法による細胞増殖測定のため、回収前に72時間培養した。

【0227】

M T S 比色アッセイは、N A D H と N A D P H の細胞縮小する能力を測定する。これらの一部は代謝活性細胞において脱水素酵素により作り出され、細胞生存度の減少に伴って減少する。M T S 試薬を製造業者により推奨されるように96ウェル細胞培養液に加え(セルタイター96アクオス・ノン・ラジオアクティブ・セルプロリフィケーション・アッセイ(AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay); プロメガ、マディソン、ウィスコンシン州)、そして、吸光度は492nmで読みとった。データは、三重決定のため、平均%抑制 $[(1 - (\text{実験の吸光度} - \text{バックグラウンドの吸光度}) / (\text{対照培養液の吸光度} - \text{バックグラウンドの吸光度})) \times 100] \pm S D$ で示される。

10

【0228】

細胞内A T P濃縮は、A T P l i t e (登録商標)ルミネセンスA T Pディテクション・アッセイ・システム(Luminescence ATP Detection Assay System)(パーキンエルマー・ライフサイエンス、ウェルズリー、マサチューセッツ州)を用い、製造業者の使用法に従い決定した。この手順は米国の特許出願番号第09/806165号明細書(出典明示により本明細書の一部とされる)に記載されている。このアッセイの長所には、感度、直線性および簡便性が挙げられる。この試験において、A T Pはホタル(Photinus pyralis)ルシフェラーゼにより光に変換され、その生じた光は、発光計数器で1秒あたりの計数(c p s)として定量化できる。環境中の、例えば手の上に存在するA T Pとこのキットの試薬との汚染を避けるために管理した。この手順の間、常に手袋を着用する。製造業者の細胞溶解溶液50マイクロリットルを、96ウェル・マイクロプレートのウェル中、100マイクロリットルの細胞懸濁液に加える。プレートを、1分につき700回転(r p m)で作動している回転振盪機上で5分の間インキュベートする。次いで、製造業者の基質溶液50マイクロリットルを、細胞可溶化物を含むウェルに加え、そして、そのプレートを700 r p mの回転振盪機で再び5分間インキュベートした。プレートを少なくとも10分間暗がりに置き、その後、発光を2つのパーキンエルマー照度計のいずれかで読みとる。各実験で、1種類の照度計だけを用いた。図8と9のデータは、三重決定のため、平均%抑制 $[(1 - \text{実験の c p s} / \text{対照の c p s}) \times 100\%] \pm S D$ として示す。

20

30

【0229】

ヒト・マウス腫瘍異種移植。7週齢のN C R雄の胸腺欠損のヌード・ホモ接合型(n u / n u)マウスは、タコニック(ジャーマンタウン、ニューヨーク州)から購入した。多くの場合4群の群あたりマウスを、1日目に 2×10^6 のB X P C - 3細胞を中腋窩線の側面に皮下接種をした。陰性対照群は、その後の処置を受けなかった(N T)。ドセタキセル群は、1週間隔3回の処置を10日目に開始し、30ミリグラム/体重キログラムで腹腔内ドセタキセルが投与された。6 F 5群は、週2回の間隔で6回の処置を6日目に開始し、100マイクログラムの抗 h C G L 2ループ・モノクローナル抗体6 F 5が投与された。6 F 5 + ドセタキセル群は、上記の用量と間隔でドセタキセルとモノクローナル抗体6 F 5が投与された。マウスは、デジタル・マイクロキャリパー装置(測径器)の使用によりヒト腫瘍異種移植片の二次元サイズを週2回評価された。腫瘍容積(立方ミリメートル)は、式(長さ \times 幅 2) $\div 2$ を用いてマウスごとに算出した。データは、平均腫瘍容積 \pm 平均の標準誤差として群について表す。

40

【0230】

実施例6

L P - D T 結合体は、h C G L 2ループに特異的なモノクローナル抗体を作り出す。

3匹の雌のC 5 7 B L / 6マウスは、融合1の前に3週間隔で4回L P - D T 結合体の接種を受けた。同種のマウスは、融合2の前に3週間隔で3回接種を受けた。それぞれ一連の免疫後、h C G に対して最も高いR I A タイターをもつマウスは、N S - 1細胞との

50

融合と、その後のハイブリドーマ産生のために犠牲にした。融合1は、モノクローナル抗体2B3・3E8(3E8)、2B3・3F5(3F5)および2B3・6A11(6A11)を産生した。融合2は、2B2・6F5(6F5)を産生した。¹²⁵I-hCGに対する特異的な結合は、すべてのモノクローナル抗体の増加と精製の後に確かめた。これら4つ全ての抗体が、IgG₁アイソタイプであることが分かった。

【0231】

LHに対する交差反応は、未標識のLHを用いた競合実験を介してRIAにより評価した。未標識のhCGによる標準曲線は、それぞれの抗体について作成し、LHを用いて作成した曲線と比較した。カウントにおいてhCG標準曲線のそれと同等の低下を引き起こすLHの相対量は、交差反応の程度を確かめるために用いた。同様の実験を、融合2から抗体6F5で行った。しかしながら、後の例で説示しない培養上清の濃度は試験した。結果を図6に示す。融合1抗体3E8、3F5および6A11は、それぞれ融合1の抗体3E8、3F5および6A11はLHに対して8.6%、12%および55%の交差反応を示した。融合2の抗体6F5は、4.6%の交差反応を示した。これらの結果は、LP-DT結合体による免疫が、-hCG L2ループの表面の接近可能な残基において、これらの2つのタンパク質間にただ1つしかアミノ酸の差異がないにもかかわらず、LHよりもhCGに強い優先的な結合をするモノクローナル抗体の産生を生じさせ得ることを示す。

10

【0232】

モノクローナル抗体2B2・6F5は、異種移植実験のためにより大量に増やした。1回の産生作業で、781ミリリットルの培養上清から、プロテインG精製により23mgの抗体を得た。限界希釈サブクロニング後の2B2・6F5を用いた第二の該産生実験では、1.5リットルの培養液から、48ミリグラムの精製抗体を得た。

20

【0233】

実施例7

抗-hCG L2ループ抗体は、LH/hCG受容体に対するhCGの結合を阻害するヨード化したhCG(0.25ngのhCG)を、二重に管内の約0.2ミリグラムのラット睾丸抽出物と一緒にインキュベートした。これは、28%の標識化hCGが結合される結果となった。次いで、これを有効な受容体に100%の結合を示すために考慮した。図7は、シリーズ1として、すべてデュプリケートでラット睾丸抽出物および0.25ngの¹²⁵I-hCGを含む管で、5、10、25、50および100ng用量のhCGを用いて作成された未標識hCGの標準曲線を示す。予想したように、この曲線は、未標識のhCGが、LH/hCG受容体に対する結合で標識化hCGと競合することを実際に示す。次いで、モノクローナル抗体3E8の増加量を、0.25ngの¹²⁵I-hCGのLH/hCG受容体に対する結合の100ngの未標識hCGによる阻害を阻止する能力について試験した。100、200、400および800ngのモノクローナル抗体3E8は、それぞれ対照結合の12%、18%、21%および29%となった。標準曲線からすると、これらの効果は、それぞれ9、24、30および50ngのhCG結合阻害を示す。これは、シリーズ2として図7に示す。かくして、モノクローナル抗体3E8は、平均で抗体1ミリグラムあたり88マイクログラムのhCGを中和した。これらの結果は、-hCG L2ループに特異的なモノクローナル抗体が、LH/hCG受容体と結合するhCGを用量依存的に阻害することを実際に示す。

30

40

【0234】

実施例8

ヒト腫瘍細胞の成長に関する抗-hCG抗体の効果

L2ロングループを標的とする3つの抗-hCG抗体のインビトロでの癌細胞系増殖をモジュレートする能力を調べた。上記の実施例で記載のように、モノクローナル抗体3F5(3E8)6A11を作製した。それぞれ、-hCGのL2ロングループに対する特異性とIgG1アイソタイプを有する。陰性対照モノクローナル抗体もまた試験した。陰性対照は、ネズミ・モノクローナル抗体・muronomab-CD3であった(OK

50

T 3 ; オルトクローン O K T 3 ; オルト・バイオテック・プロダクト、L . P .、ブリッジウォーター、ニュージャージー州)。これらの4つの抗体はそれぞれ、次の3つの癌細胞系に対してインビトロでの活性を試験した。B X P C - 3 膵臓癌細胞は、 α -h C G を産生するが、L H / h C G 受容体は発現しない。M C F - 7 乳癌細胞は、相対的にほとんど α -h C G を産生しないが、L H / h C G 受容体を発現する。ヒラ子宮頸癌細胞は α -h C G を産生し、L H / h C G 受容体を発現するが、 β -h C G を産生しない。

【 0 2 3 5 】

1.0×10^3 の細胞を、細胞増殖アッセイ前に、72時間2または20 μ g の精製モノクローナル抗体と共に三重でインキュベートした。2つの細胞増殖アッセイを用いた。上記実施例に記載のように、それらは細胞の縮小能力 (M T S) または細胞内 A T P 濃度 (A T P l i t e) のいずれかに基づいた。

10

【 0 2 3 6 】

図8で示すように、各抗 α -h C Gモノクローナル抗体は、 α -h C G を産生し分泌することが知られているB X P C - 3 膵癌細胞のインビトロで増殖を阻害した。増殖の阻害は、各抗体によって用量依存的であった。それぞれの例において、細胞内 A T P 濃度 (A T P l i t e) に対する効果は、M T S による細胞の縮小能に対する効果より大きかった。対照的に、3つのモノクローナル抗体のいずれも、M C F - 7 または H e L a 細胞の増殖には何ら識別できる影響も及ぼさなかった。予想されたように、O K T 3 は、3つの細胞系のいずれにも影響を及ぼさなかった (データは示さない) 。このように、L 2 ロングループを標的とする抗 α -h C G 抗体は、 α -h C G を発現しない細胞でなく α -h C G を発現する細胞の増殖を阻害する単一の試薬として機能する。

20

【 0 2 3 7 】

実施例 9

抗 α -h C G L 2 ループ抗体は、細胞傷害化学療法と相乗作用を示す

インビトロで癌細胞系の増殖をモジュレートする細胞傷害性化学療法と相乗作用する、L 2 ロングループを標的とする抗 α -h C G 抗体の能力もまた試験した。モノクローナル抗体 6 F 5 は、上記の実施例に記載のように産生した。この抗体は、 α -h C G の L 2 ロングループに特異的に結合し、また I g G₁ アイソタイプを有する。陰性対照のモノクローナル抗体もまた試験した。陰性対照は、マウスモノクローナル抗体 m u r o m o n a b - C D 3 (O K T 3 ; Orthoclone OKT3 ; Ortho Biotech Products, L.P., ブリッジウォーター、ニュージャージー州)であった。O K T 3 は、ヒト T リンパ球に見られる C D 3 抗原に特異的であり、以下に記載の上皮癌細胞に結合しない。モノクローナル抗体 6 F 5 および O K T 3 は、膵臓癌および/または乳癌の処置に関して米国食品医薬品局 (F D A) により認可された2種の細胞障害性化学療法薬と組み合わせて試験した。ゲムシタピン (ジェムザール (登録商標)、イーライリリー・アンド・カンパニー、インディアナポリス、インディアナ州)、代謝拮抗物質は、フッ素置換されたデオキシシチジン類似体であり、進行性の膵臓癌と転移性乳癌の両方の処置について F D A の認証を受けている。ドセタキセル (タキソテル (登録商標)、サノフィ - アベンティス、ブリッジウォーター、ニュージャージー州)は、微小管を標的とする半合成タキサンであり、先の化学療法不適合後の乳癌の処置について F D A の認証を受けている。B X P C - 3 膵臓癌細胞は、 α -h C G を産生するが、L H / h C G 受容体を発現しない。M C F - 7 乳癌細胞は、相対的にほとんど α -h C G を発現しないが、L H / h C G 受容体を発現する。

30

40

【 0 2 3 8 】

1.0×10^3 個の細胞を、ゲムシタピンまたはドセタキセルの付加前に24時間、20 μ g の精製した6 F 5 または O K T 3 を用いて三重でインキュベートした。最終のドセタキセル濃度は、0、1、3、10、30および100ナノグラム毎ミリリットルであった。最終のゲムシタピン濃度は、0、5、10、20、40、80および160ナノモラーであった。細胞障害性化学療法剤の存在下の48時間の培養後、細胞増殖を、上記実施例に記載のように細胞内 A T P 濃度 (A T P l i t e) アッセイにより評価した。図9に示すデータは、3回の細胞内 A T P アッセイ全ての平均阻害パーセントとして示す。デ

50

ータは、L2-ロンググループを標的とする抗-hCGモノクローナル抗体が、-hCGを産生し分泌することが知られている癌細胞の細胞増殖を低下させるにあたって、細胞障害性化学療法を用いて相乗作用を示すことを示す。

【0239】

モノクローナル抗体6F5を用いた前処理は、BXP C-3細胞に対するドセタキセルの抗増殖活性を増大させた($p = 0.00001$ 、対応のあるt検定)。代謝拮抗物質ゲムシタピンの抗増殖活性は、有意に向上しなかった。期待されたように、モノクローナル抗体6F5は、-hCGを産生しないMCF-7細胞に対し、どちらの細胞障害物質の抗増殖活性も増大させなかった。これらをもとにすると、これらの結果は、L2ロンググループを標的とする抗-hCGモノクローナル抗体は、-hCGを産生するヒト癌細胞の細胞増殖を低下させるにあたって、微小管を標的とする細胞障害性化学療法(ドセタキセル)と相乗作用を発揮することを示す。

10

【0240】

実施例10

抗-hCG L2グループ抗体は、ヒト-マウス腫瘍異種移植片を抑制する

インビボで癌細胞の増殖をモジュレートするL2ロンググループを標的とする抗-hCG抗体の能力もまた試験した。モノクローナル抗体6F5は、上記の実施例に記載のように産生した。モノクローナル抗体6F5は、ドセタキセル(タキソテル(登録商標)、サノフィ-アベンティス、ブリッジウォーター、ニュージャージー州)、微小管を標的とする半合成タキサンと組み合わせて試験した。BXP C-3脾臓癌細胞は-hCGを産生するが、LH/hCG受容体を発現しない。数週齢のNCR雌の無胸腺ヌードホモ接合体(nu/nu)マウス(タコニック、ジャーマンタウン、ニューヨーク州)を、BXP C-3ヒト脾臓癌異種移植片を接種した。1群あたり10匹のマウスからなる4つの実験群で研究した。群には、未処理(NT)とドセタキセル、抗-hCGモノクローナル抗体6F5のみ、また抗体6F5とドセタキセルを用いて処理した動物が含まれる。

20

【0241】

図10は、L2ロンググループを標的とする抗-hCGモノクローナル抗体もまた、インビボで腫瘍の成長を、それ自身により、また細胞傷害性化学療法との相乗作用により減じることができる。

【0242】

2×10^6 の培養BXP C-3腫瘍細胞を、1日目に各マウスの中腋窩線の側面に接種した。抗体を受ける動物は、100マイクログラムの精製6F5を、腹膜内経路を介して6、9、13、16、20および23日目にそれぞれ与えられた。これは、6日目に開始して週2回を3週間である。化学療法を受ける動物は、30mg/kgドセタキセルを、腹膜内経路を介して10、17および24日目にそれぞれ与えられた。これは、10日目に開始して週1回を3週間である。すべてのマウスの腫瘍は、2~3日ごとにキャリパスを用いて二次元的に測定した。腫瘍容積は、式(長さ \times 幅²) \div 2を用いて計算した。図10に示すデータは、平均の腫瘍容積 \pm 標準誤差(SEM、N=10)として表す。

30

【0243】

抗-hCGモノクローナル抗体6F5を用いたマウス処理もまた、NT陰性対照群と比較して、インビボで顕著な抗腫瘍活性を示す結果となった($p = 0.000001$ 、対応のあるt検定)。さらに、異種移植片を有するマウスの抗体6F5を用いた処理もまた、ドセタキセル単独の処理と比較して、インビボでドセタキセルの抗腫瘍活性を向上させた($p = 0.00001$ 、対応のあるt検定)。これらの結果は、インビボで得られた結果を確認し、拡大するものである。我々は、-hCGのL2ロンググループに対するモノクローナル抗体それ自身が、ヒト脾臓癌に対してインビボで顕著な抗腫瘍活性を生じることを見出した。この抗腫瘍活性は、癌細胞表面にある同起源の受容体に対する-hCGの結合を阻害するこの抗体の能力と一致する。さらに、記載のモノクローナル抗体は、別の試薬、ドセタキセルと相乗効果を示した。ドセタキセルは、別個の機構により、微小管機能を干渉することにより作用し、癌の処理に有効であることが知られている。このよ

40

50

うに、記載のモノクローナル抗体は、既存の明白な有効性のある癌治療を補充し、無毒な癌治療の創設についての期待を提供する。

【0244】

実施例 1 1

- h C G L 2 ループモノクローナル抗体重鎖の D N A 配列およびアミノ酸配列

図 1 1 は、m A b 2 B 2 . 6 F 5 重鎖の D N A 配列およびアミノ酸配列、ならびに m A b 2 B 3 . 3 E 8 重鎖の D N A 配列およびアミノ酸配列、ならびに m A b 2 B 3 . 3 F 5 重鎖の D N A 配列およびアミノ酸配列を示す。読み取り枠は強調して示す。m A b 2 B 3 . 3 E 8 重鎖のアミノ酸配列、および m A b 2 B 3 . 3 F 5 重鎖のアミノ酸配列は、同じ重鎖配列を示す。

【0245】

範囲を物理的性質、例えば分子量、または化学的性質、例えば化学式について用いる場合、範囲および具体的なその実施態様のすべての組み合わせおよび部分的な組み合わせは包含されることを意図する。

【0246】

本明細書中で引用もしくは記載する特許、特許出願および文献はそれぞれ、その全部を出典明示により本明細書の一部とされる。

【0247】

当業者であれば、本発明の実施形態に対して様々な変更及び改変を行うことができ、そのような変更および改変は、本発明の精神から逸脱することなく行うことができる。従って、添付する特許請求の範囲は、そのような均等的な変化に及び、本発明の精神および目的の範囲内にあるものと考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0248】

【図 1 A】 h C G および代謝産物の構造の図を示す。

【図 1 B】 - h C G L 2 ロングループの近接のアミノ酸配列を示す。

【図 2】それぞれの受容体に結合するゴナドトロピンヘテロ二量体および h C G 鎖の概略図を示す。

【図 3】ゴナドトロピン L 2 ロングループに特異的な免疫の生成の概略図を示す。

【図 4】ゴナドトロピン L 2 ループに特異的なモノクローナル抗体による受容体結合の障害の概略図を示す。

【図 5】ゴナドトロピン 鎖に対する特異性を与える抗体結合断片により標的化される、免疫エフェクター機能の概略図を示す。

【図 6】 h C G 対 L H のモノクローナル抗体の相対的な親和力を示す。

【図 7】 h C G の L H / h C G 受容体に対する結合のモノクローナル抗体による障害を示す。

【図 8】インビトロにおける癌細胞増殖における抗体の効果を示す。

【図 9】インビトロにおける、癌細胞増殖を抑制するモノクローナル抗体の化学療法との相乗作用を示す。

【図 1 0】インビボでの腫瘍増殖におけるモノクローナル抗体の効果を示す。

【図 1 1】 m A b 2 B 2 . 6 F 5 重鎖の D N A およびアミノ酸配列、 m A b 2 B 3 . 3 E 8 重鎖の D N A およびアミノ酸配列、および m A b 2 B 3 . 3 F 5 重鎖の D N A およびアミノ酸配列を示す。

10

20

30

40

【 図 1 A 】

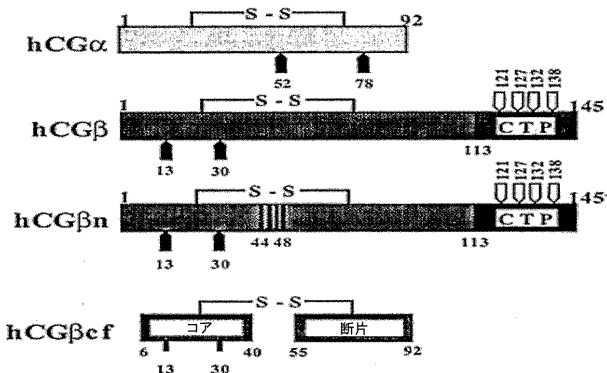


Figure 1A

【 図 1 B 】

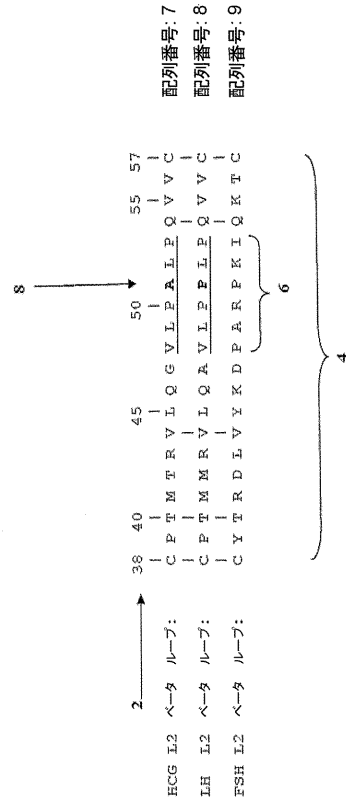


Figure 1B

【 図 2 】

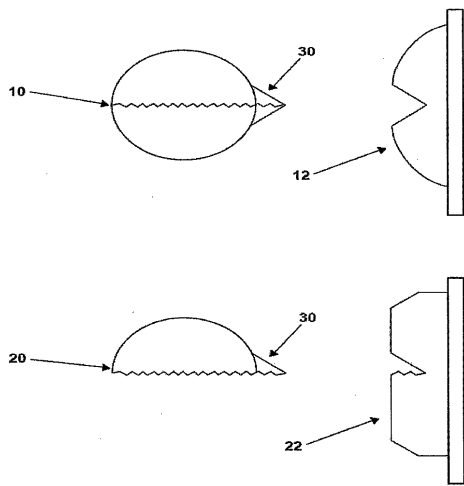


Figure 2

【 図 3 】

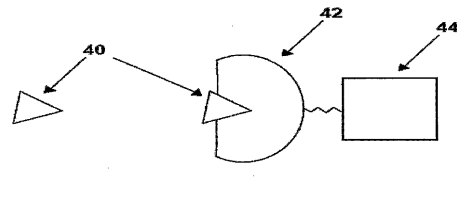


Figure 3

【 図 4 】

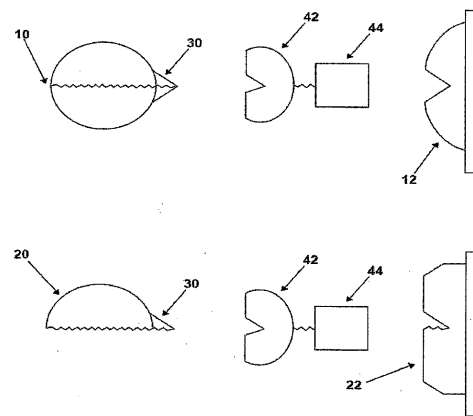


Figure 4

【 図 5 】

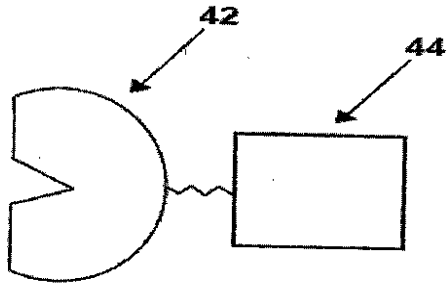


Figure 5

【 図 6 】

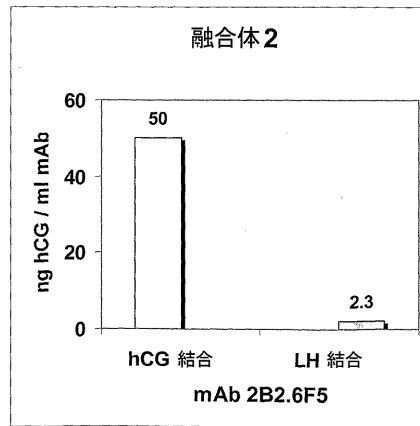
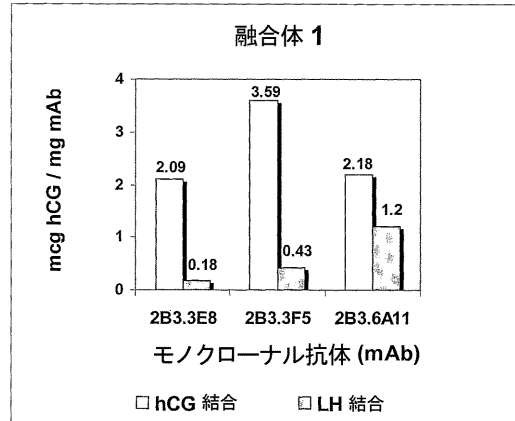


Figure 6

【 図 7 】

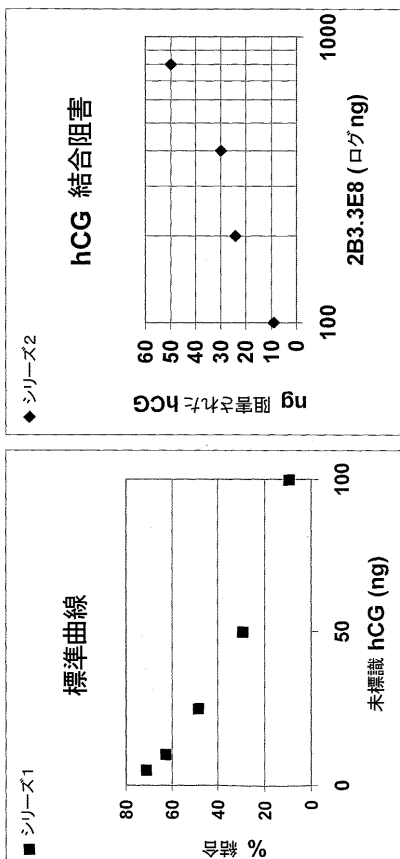


Figure 7

【 図 8 】

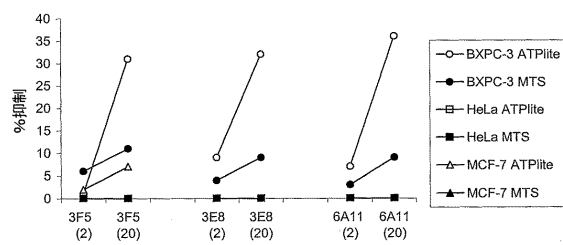


Figure 8

【手続補正書】

【提出日】平成20年4月3日(2008.4.3)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2009504659000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US06/30988	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: A61K 39/395(2006.01);G01N 33/574(2006.01);C12P 21/04(2006.01);21/08(2006.01);C07K 16/00(2006.01) USPC: 424/139.1,142.1,145.1,155.1;435/7.23,69.6,70.21;530/387.9,388.15,388.24,388.8 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. : 424/139.1, 142.1, 145.1, 155.1; 435/7.23, 69.6, 70.21; 530/387.9, 388.15, 388.24, 388.8 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) Please See Continuation Sheet			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
Y	KALANTAROV G. et al. Demonstration of Dose Dependent Cytotoxic Activity in Cancer Cells by Specific Human Chorionic Gonadotropin Monoclonal Antibodies. Cancer. 1998, Vol. 83, pages 783-787, see entire document.	1-80	
Y	MOULTON H. M. et al. Active Specific Immunotherapy with a Beta-Human Chorionic Gonadotropin Peptide Vaccine in Patients with Metastatic Colorectal Cancer: Antibody Response is Associated with Improved Survival. Clinical Cancer Research. July 2002, vol. 8, pages 2044-2051, see entire document.	1-80	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 07 May 2007 (07.05.2007)		Date of mailing of the international search report 24 MAY 2007	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer David J. Blanchard Telephone No. (571) 272-1600	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US06/30988

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

WEST, medline, embase esbiobase, scisearch, lifesci, biosis, biotechno, biotechds, biotechabs, dissabs, geneseq, isused patents, published applications, PIR 80, UniProt
search terms:SEQ ID numbers, human chorionic gonadotropin (hCG), beta-L2 loop, 2B2.6P5, 2B3.3E8, LH/hCG receptor, cancer, tumor, inventor name

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 5/24 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 15/08 (2006.01)	A 6 1 P 5/24	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/08	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 15/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	A 6 1 P 15/04	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 C	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z	
	G 0 1 N 33/50 Z	

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

(72) 発明者 エドウィン・ピー・ロック

アメリカ合衆国 2 0 8 1 7 メリーランド州ベセスダ、サウスウィック・ストリート 5 6 0 4 番

(72) 発明者 バーン・シー・スティーブンス

アメリカ合衆国 4 3 0 1 7 オハイオ州ダブリン、リバー・フォレスト・ロード 5 4 8 9 番

(72) 発明者 ビエール・エル・トリオッジ

アメリカ合衆国 4 4 1 2 0 オハイオ州シェイカー・ハイツ、リッチフィールド・ロード 2 9 7 0 番

F ターム (参考) 2G045 AA40 BB20 CB02 DA36 FA11 FB01 FB03
 4B024 AA01 AA12 BA44 CA01 GA11 HA01 HA15
 4B065 AA90Y AB01 AC14 BA01 CA25 CA44 CA46
 4C084 AA13 NA14 ZB261
 4C085 AA14 CC23 EE01 FF24
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26
 4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA28 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	抗体组合物，治疗肿瘤疾病的方法，		
公开(公告)号	JP2009504659A	公开(公告)日	2009-02-05
申请号	JP2008526153	申请日	2006-08-08
[标]申请(专利权)人(译)	ONCONON		
[标]发明人	エドウィン・ピー・ロック バーノン・シー・スティーブンス ピエール・エル・トリオッジ		
发明人	エドウィン・ピー・ロック バーノン・シー・スティーブンス ピエール・エル・トリオッジ		
IPC分类号	C07K16/26 C12N15/09 A61K39/395 A61K31/7088 A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00 A61P35/02 A61P35/04 A61P5/24 A61P15/08 A61P29/00 A61P31/04 A61P25/28 A61P15/04 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/53 G01N33/15 G01N33/50		
CPC分类号	A61P15/04 A61P15/08 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P35/02 C07K16/241 C07K16/26 C07K2317/34 C07K2317/52 C07K2317/55 C07K2317/73 C07K2319/00		
FI分类号	C07K16/26 C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A A61K39/395.N A61K31/7088 A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00.111 A61P35/02 A61P35/04 A61P5/24 A61P15/08 A61P29/00.101 A61P31/04 A61P25/28 A61P15/04 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A G01N33/53.C G01N33/15.Z G01N33/50.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB02 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FB01 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA44 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA15 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C085/AA14 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/FF24 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	60/706506 2005-08-08 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了抗体组合物和抑制促性腺激素作用的方法。本发明提供了一种治疗癌症的方法和一种通过将抗体组合物给予有需要的哺乳动物受试者来调节生育力的方法。

