(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2013-511260
(P2013-511260A)
(43)公表日　平成25年4月4日(2013.4.4)

| (51)Int.Cl. | | F I | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| ***C12N 5/10*** | ***(2006.01)*** | C12N | 5/00 | 102 | 4B065 |
| ***G01N 33/53*** | ***(2006.01)*** | G01N | 33/53 | N | 4C076 |
| ***G01N 33/533*** | ***(2006.01)*** | G01N | 33/533 | | 4C084 |
| ***G01N 33/535*** | ***(2006.01)*** | G01N | 33/535 | | 4C085 |
| ***G01N 33/534*** | ***(2006.01)*** | G01N | 33/534 | | 4H045 |

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 151 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-539082 (P2012-539082)
(86)(22)出願日　平成22年11月17日 (2010.11.17)
(85)翻訳文提出日　平成24年5月15日 (2012.5.15)
(86)国際出願番号　PCT/US2010/057046
(87)国際公開番号　WO2011/062997
(87)国際公開日　平成23年5月26日 (2011.5.26)
(31)優先権主張番号　61/261,909
(32)優先日　平成21年11月17日 (2009.11.17)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　509011835
エムユーエスシー　ファウンデーション　フォー　リサーチ　ディベロップメント
アメリカ合衆国　サウスカロライナ　２９４２５，　チャールストン，　ハーグッド　アベニュー　１９，　スイート　９０９
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒトヌクレオリンに対するヒトモノクローナル抗体

(57)【要約】
本発明は、ヒトヌクレオリンに対するヒトモノクローナル抗体を生成する方法、このような抗体を生成する細胞、ならびに該抗体自体を提供する。また、悪性疾患および非悪性疾患の診断および治療において該抗体を用いる方法であって、それらの表面においてヌクレオリンを発現する細胞が、該疾患の病態生理に寄与する方法も提供される。本発明の一態様では、ヒトヌクレオリンに結合する抗体を分泌する不死化ヒトＢ細胞を生成する方法を提供し、この方法は、ＩｇＭ陽性ヒトＢ細胞の集団を得るステップと、該集団を、該ヒトＢ細胞を不死化させるエプスタイン－バーウイルス（ＥＢＶ）、およびＩｇＭからＩｇＧへの免疫グロブリンアイソタイプのクラススイッチを誘導するサイトカイン／増殖因子／シグナル伝達剤カクテルと接触させるステップと、該不死化ならびに免疫グロブリンアイソタイプのクラススイッチを支援する条件下で細胞を培養するステップとを含む。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒトヌクレオリンに結合する抗体を分泌する不死化ヒトＢ細胞を生成する方法であって、
（ａ）ＩｇＭ陽性ヒトＢ細胞の集団を得るステップと、
（ｂ）前記集団を、
（ｉ）前記ヒトＢ細胞を不死化させるエプスタイン－バーウイルス（ＥＢＶ）、および
（ｉｉ）ＩｇＭからＩｇＧへの免疫グロブリンアイソタイプのクラススイッチを誘導するサイトカイン／増殖因子／シグナル伝達剤カクテル
と接触させるステップと、
（ｃ）前記不死化および前記免疫グロブリンアイソタイプのクラススイッチを支援する条件下で細胞を培養するステップと
を含む、方法。
【請求項２】
（ｄ）ヒトヌクレオリンに対する抗体を発現する不死化ヒトＢ細胞を選択するステップをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
選択するステップが、不死化Ｂ細胞の培養培地上清に対して実施されるイムノアッセイを含む、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記サイトカインカクテルが、共起刺激シグナルをヒトＢ細胞に送達する作用物質を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
前記サイトカインカクテルが、抗ＩｇＭ Ｆ（ａｂ’）$_2$インターロイキン（ＩＬ）－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、ＩＮＦα、ＢＡＦＦ、可溶性ＣＤ４０Ｌを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記ＩｇＭ陽性ヒトＢ細胞の集団を、末梢血、扁桃腺、骨髄、脾臓、リンパ節、臍帯血、肝臓、アフェレーシス手順、またはバフィコートから得る、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
ステップ（ｄ）の不死化ヒトＢ細胞から、重鎖および／または軽鎖の全体をコードする核酸を単離するステップをさらに含む、請求項２に記載の方法。
【請求項８】
ステップ（ｄ）の不死化ヒトＢ細胞から、重鎖および／または軽鎖の抗原結合領域をコードする核酸を単離するステップをさらに含む、請求項２に記載の方法。
【請求項９】
前記核酸を、重鎖および／または軽鎖のフレームワーク領域をコードする核酸へとクローニングするステップをさらに含む、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
ステップ（ｂ）が、感染時におけるＥＢＶの濃縮ステップ、遠心分離ステップ、またはこれらの両方をさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１１】
ステップ（ｃ）の後に、前記ヒトＢ細胞集団を凍結させるステップをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
ステップ（ｂ）（ｉｉ）の約０～９６時間後にステップ（ｂ）（ｉｉ）を実施する、請求項１に記載の方法。
【請求項１３】
ステップ（ｂ）（ｉｉ）の約１６～２０時間後にステップ（ｂ）（ｉｉ）を実施する、

請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記集団のうちの約５０％～９９％を、ＥＢＶ感染により不死化させる、請求項１に記載の方法。
【請求項１５】
前記集団のうちの約９５％～９９％を、ＥＢＶ感染により不死化させる、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
ステップ（ｄ）を、感染の１～４週間後に行う、請求項２に記載の方法。
【請求項１７】
ステップ（ｄ）を、感染の２～３週間後に行う、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
ステップ（ｄ）を、凍結保存した不死化Ｂ細胞を融解させた後に、かつ／または前記不死化Ｂ細胞に由来する凍結保存した培養培地上清を融解させた後に行う、請求項２に記載の方法。
【請求項１９】
前記Ｂ細胞が、抗原ナイーブ細胞である、請求項１に記載の方法。
【請求項２０】
前記Ｂ細胞が、抗原経験細胞である、請求項１に記載の方法。
【請求項２１】
ヒトヌクレオリンに結合するＩｇＧ抗体を発現する不死化ヒトＢ細胞。
【請求項２２】
配列番号２のタンパク質に結合するＩｇＧ抗体を発現する不死化ヒトＢ細胞。
【請求項２３】
配列番号１によりコードされるタンパク質に結合するＩｇＧ抗体を発現する不死化ヒトＢ細胞。
【請求項２４】
配列番号４を含むタンパク質に結合するＩｇＧ抗体を発現する不死化ヒトＢ細胞。
【請求項２５】
配列番号３によりコードされるタンパク質に結合するＩｇＧ抗体を発現する不死化ヒトＢ細胞。
【請求項２６】
前記ＩｇＧ抗体が、ＩｇＧ１抗体、ＩｇＧ２抗体、ＩｇＧ３抗体、またはＩｇＧ４抗体である、請求項２１から２５に記載の不死化ヒトＢ細胞。
【請求項２７】
前記ＩｇＧ抗体が、ＩｇＧ１抗体である、請求項２１から２５に記載の不死化ヒトＢ細胞。
【請求項２８】
前記ＩｇＧ抗体が、カッパ軽鎖を含む、請求項２１から２５に記載の不死化ヒトＢ細胞。
【請求項２９】
前記ＩｇＧ抗体が、ラムダ軽鎖を含む、請求項２１から２５に記載の不死化ヒトＢ細胞。
【請求項３０】
ＥＢＶにより不死化させた、請求項２１から２５に記載の不死化ヒトＢ細胞。
【請求項３１】
Ｔ－５Ｄ１、Ｖ－３Ｈ１１（３Ｇ５）、Ｔ－２Ｄ３、Ｔ－７Ｇ７（１Ｈ９）、Ｔ－２Ｈ３、Ｔ－９Ｆ９、Ｔ－８Ｇ４、またはＴ－Ｐ１Ｃ６と命名されている、請求項２１に記載の不死化ヒトＢ細胞。
【請求項３２】

受託番号＿＿＿として寄託されている不死化ヒトＢ細胞であって、それぞれ、クローン５Ｄ１、クローン３Ｈ１１（３Ｇ５）、クローン２Ｄ３、クローン７Ｇ７（１Ｈ９）、クローン２Ｈ３、クローン９Ｆ９、クローン８Ｇ４、またはクローンＰ１Ｃ６と命名されており、２０１０年１１月１７日に、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎに寄託されている不死化ヒトＢ細胞。

【請求項３３】

請求項２１から２５に記載の細胞により生成される、単離抗体またはその断片。

【請求項３４】

モノクローナル抗体またはその断片である、請求項３３に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項３５】

ヒトに対して実質的に非免疫原性である、請求項３３に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項３６】

ヒト抗体またはその断片である、請求項３３に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項３７】

配列番号４のタンパク質に特異的に結合する、単離ヒトモノクローナル抗体またはその断片。

【請求項３８】

ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる、請求項３３から３７に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項３９】

ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる、請求項３３から３７に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項４０】

ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインに結合する、請求項３３から３７に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項４１】

ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインを不活化させる、請求項３３から３７に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項４２】

癌細胞に対する補体依存性細胞傷害を誘導する、請求項３３から３７に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項４３】

癌細胞に対する補体非依存性細胞傷害を誘導する、請求項３３から３７に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項４４】

接触時に癌細胞においてアポトーシスを誘導する、請求項３３から３７に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項４５】

ＡＭＬ癌細胞、ＣＬＬ癌細胞、または乳癌細胞を阻害するかまたは死滅させる、請求項３３から３７に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項４６】

癌細胞におけるＢＣＬ－２レベルを低減する、請求項３３から３７に記載の単離抗体またはその断片。

【請求項４７】

ヒトヌクレオリンタンパク質に特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、前記Ｍ

ＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる、単離抗体またはその断片。
【請求項４８】
ヒトヌクレオリンタンパク質に特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる、単離抗体またはその断片。
【請求項４９】
前記ヒトヌクレオリンのアミノ酸配列が、配列番号２を含む、請求項４７または４８に記載の抗体またはその断片。
【請求項５０】
配列番号２のアミノ酸残基１～２８３からなるアミノ酸配列に結合する、請求項４７または４８に記載の抗体またはその断片。
【請求項５１】
モノクローナル抗体またはその断片である、請求項４７または４８に記載の抗体またはその断片。
【請求項５２】
ヒトに対して実質的に非免疫原性である、請求項４７または４８に記載の抗体またはその断片。
【請求項５３】
ヒト抗体またはその断片である、請求項４７または４８に記載の抗体またはその断片。
【請求項５４】
ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインに結合する、請求項４７または４８に記載の抗体またはその断片。
【請求項５５】
ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインを不活化させる、請求項４７または４８に記載の抗体またはその断片。
【請求項５６】
診断剤または治療剤に連結されている、請求項４７または４８に記載の抗体またはその断片。
【請求項５７】
癌細胞に対する補体依存性細胞傷害を呈示する、請求項４７または４８に記載の抗体またはその断片。
【請求項５８】
癌細胞に対する補体非依存性細胞傷害を呈示する、請求項４７または４８に記載の抗体またはその断片。
【請求項５９】
接触時に癌細胞においてアポトーシスを誘導する、請求項４７または４８に記載の抗体またはその断片。
【請求項６０】
ＡＭＬ癌細胞、ＣＬＬ癌細胞、または乳癌細胞を阻害するかまたは死滅させる、請求項４７または４８に記載の抗体またはその断片。
【請求項６１】
癌細胞におけるＢＣＬ－２レベルを低減する、請求項４７または４８に記載の抗体またはその断片。
【請求項６２】
診断剤に連結されている、請求項４７または４８に記載の抗体またはその断片。
【請求項６３】
前記診断剤が、放射性核種、フルオロフォア、化学発光化合物、蛍光化合物、または酵素である、請求項６２に記載の抗体またはその断片。
【請求項６４】
治療剤に連結されている、請求項４７または４８に記載の抗体またはその断片。

【請求項６５】
前記治療剤が、放射性核種、毒素、または化学療法剤部分である、請求項６４に記載の抗体またはその断片。
【請求項６６】
ヒトヌクレオリンタンパク質に特異的に結合する１または複数の単離抗体またはそれらの断片を含む抗ヌクレオリン組成物であって、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、前記１または複数の抗体が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる、抗ヌクレオリン組成物。
【請求項６７】
前記１または複数の単離抗体またはそれらの断片が、モノクローナル抗体またはその断片である、請求項６６に記載の抗ヌクレオリン組成物。
【請求項６８】
前記１または複数の単離抗体またはそれらの断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である、請求項６６に記載の抗ヌクレオリン組成物。
【請求項６９】
前記１または複数の単離抗体またはそれらの断片が、ヒト抗体またはその断片である、請求項６６に記載の抗ヌクレオリン組成物。
【請求項７０】
前記１または複数の単離抗体またはそれらの断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインに結合する、請求項６６に記載の抗ヌクレオリン組成物。
【請求項７１】
前記１または複数の単離抗体またはそれらの断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインを不活化させる、請求項６６に記載の抗ヌクレオリン組成物。
【請求項７２】
前記ヒトヌクレオリンのアミノ酸配列が、配列番号２を含む、請求項４７または４８に記載の抗体またはその断片。
【請求項７３】
前記１または複数の単離抗体またはそれらの断片が、配列番号４に結合する、請求項６６に記載の抗ヌクレオリン組成物。
【請求項７４】
放射性核種、フルオロフォア、化学発光化合物、蛍光化合物、酵素、毒素、または化学療法剤をさらに含む、請求項６６に記載の抗ヌクレオリン組成物。
【請求項７５】
前記放射性核種、フルオロフォア、化学発光化合物、蛍光化合物、酵素、毒素、または化学療法剤が、前記１または複数の単離抗体またはそれらの断片にコンジュゲートされている、請求項６６に記載の抗ヌクレオリン組成物。
【請求項７６】
前記ヒトヌクレオリンタンパク質に特異的に結合する２つ以上の単離抗体またはそれらの断片を含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、前記１または複数の抗体が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる、請求項６６に記載の抗ヌクレオリン組成物。
【請求項７７】
前記ヒトヌクレオリンタンパク質に特異的に結合する３つ以上の単離抗体またはそれらの断片を含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、前記１または複数の抗体が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる、請求項６６に記載の抗ヌクレオリン組成物。
【請求項７８】
ヌクレオリンをその表面に発現する細胞を阻害するかまたは死滅させる方法であって、前記細胞を、ヒトヌクレオリンに結合する抗体またはその断片と接触させるステップを含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、

前記抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる、方法。

【請求項７９】

前記抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である、請求項７８に記載の方法。

【請求項８０】

前記抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である、請求項７８に記載の方法。

【請求項８１】

前記抗体またはその断片が、配列番号２に結合する、請求項７８に記載の方法。

【請求項８２】

前記抗体またはその断片が、配列番号１によりコードされるアミノ酸配列に結合する、請求項７８に記載の方法。

【請求項８３】

前記抗体またはその断片が、配列番号４に結合する、請求項７８に記載の方法。

【請求項８４】

前記抗体またはその断片が、配列番号３によりコードされるアミノ酸配列に結合する、請求項７８に記載の方法。

【請求項８５】

前記細胞が、癌細胞である、請求項７８に記載の方法。

【請求項８６】

前記癌細胞が、肺癌細胞、乳癌細胞、前立腺癌細胞、結腸癌細胞、膵臓癌細胞、腎細胞癌細胞、卵巣癌細胞、白血病細胞、黒色腫細胞、膠芽腫細胞、神経芽腫細胞、肉腫細胞、または胃癌細胞である、請求項７８に記載の方法。

【請求項８７】

前記細胞が、免疫細胞である、請求項７８に記載の方法。

【請求項８８】

前記免疫細胞が、リンパ球、樹状細胞、末梢血単球、マクロファージ、または神経膠細胞である、請求項８７に記載の方法。

【請求項８９】

前記抗体またはその断片が、治療剤に連結されている、請求項７８から８８に記載の方法。

【請求項９０】

前記治療剤が、放射性核種、毒素、または化学療法剤である、請求項８９に記載の方法。

【請求項９１】

前記阻害するかまたは死滅させることが、前記細胞においてアポトーシスを誘導するステップを含む、請求項７８に記載の方法。

【請求項９２】

前記細胞が、ヒト被験体体内に存在し、前記接触させるステップが、前記抗体またはその断片を前記被験体に投与するステップを含む、請求項７８に記載の方法。

【請求項９３】

前記細胞を、少なくとも１つのさらなる阻害剤または治療と接触させるステップをさらに含む、請求項７８に記載の方法。

【請求項９４】

前記さらなる治療が、手術、放射線療法、化学療法、毒素療法、免疫療法、ホルモン療法、抗血管新生療法、もしくは遺伝子療法、または他の生物学的療法のうちの１または複数を含む、請求項９３に記載の方法。

【請求項９５】

前記さらなる阻害剤が、放射性核種、化学療法剤、毒素、免疫療法剤、ホルモン、核酸

、またはポリペプチドのうちの１または複数を含む、請求項９３に記載の方法。
【請求項９６】
前記毒素が、ジフテリア毒素、外毒素Ａ鎖、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシンＡ鎖、アルファ－サルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ　ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ジアンチンタンパク質、ｐｈｙｔｏｌａｃａ　ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質、ブタクサ抗ウイルス性タンパク質、ｍｏｍｏｒｄｉｃａ　ｃｈａｒａｎｔｉａ阻害剤、クルシン、クロチン、ｓａｐａｏｎａｒｉａ　ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、カリケアマイシン、またはトリコテセン毒素である、請求項９５に記載の方法。
【請求項９７】
前記化学療法剤が、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞骨格破壊剤、エポチロン、トポイソメラーゼＩ阻害剤、トポイソメラーゼＩＩ阻害剤、ヌクレオシド類似体もしくはヌクレオチド類似体、前駆体類似体、ペプチド抗生物質、白金ベースの薬剤、レチノイド、ビンカアルカロイド、またはそれらの誘導体である、請求項９５に記載の方法。
【請求項９８】
前記化学療法剤が、アクチノマイシン－Ｄ、ａｌｌ－ｔｒａｎｓレチノイン酸、アザシチジン、アドリアマイシン、アザチオプリン、ブレオマイシン、カンプトテシン、カルボプラチン、カペシタビン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エポチロン、エトポシド、フルオロウラシル、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、過酸化水素、イダルビシン、イマチニブ、メクロレタミン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシンＣ、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、バルルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、またはビノレルビンである、請求項９５に記載の方法。
【請求項９９】
ヌクレオリンをその表面に発現する細胞を検出する方法であって、前記細胞を、前記ヌクレオリンに免疫学的に結合するヒト抗体またはその断片と接触させるステップを含む、方法。
【請求項１００】
前記細胞が、癌細胞、免疫細胞、ヌクレオリンをその表面に発現する血管平滑筋細胞、ヌクレオリンをその表面に発現する内皮細胞、またはウイルスに感染した細胞である、請求項９９に記載の方法。
【請求項１０１】
前記細胞が、ヌクレオリンをその表面に発現する前癌性細胞である、請求項９９に記載の方法。
【請求項１０２】
前記癌細胞が、肺癌細胞、乳癌細胞、前立腺癌細胞、結腸癌細胞、膵臓癌細胞、腎細胞癌細胞、卵巣癌細胞、白血病細胞、黒色腫細胞、膠芽腫細胞、神経芽腫細胞、肉腫細胞、または胃癌細胞からなる群から選択される、請求項９９に記載の方法。
【請求項１０３】
前記免疫細胞が、リンパ球、樹状細胞、末梢血単球、マクロファージ、または神経膠細胞である、請求項９９に記載の方法。
【請求項１０４】
前記細胞が、免疫細胞である、請求項９９に記載の方法。
【請求項１０５】
前記免疫細胞が、活性化免疫細胞である、請求項９９に記載の方法。
【請求項１０６】
前記免疫細胞が、活性化Ｂ細胞である、請求項９９に記載の方法。
【請求項１０７】

前記免疫細胞が、メモリーＢ細胞である、請求項９９に記載の方法。
【請求項１０８】
前記免疫細胞が、活性化Ｔ細胞である、請求項９９に記載の方法。
【請求項１０９】
前記免疫細胞が、活性化ＣＤ４＋Ｔ細胞である、請求項９９に記載の方法。
【請求項１１０】
前記免疫細胞が、活性化ＣＤ８＋Ｔ細胞である、請求項９９に記載の方法。
【請求項１１１】
前記細胞が、血管平滑筋細胞または内皮細胞である、請求項９９に記載の方法。
【請求項１１２】
前記抗体またはその断片が、診断剤に連結されている、請求項９９に記載の方法。
【請求項１１３】
前記診断剤が、放射性核種、フルオロフォア、化学発光化合物、蛍光化合物、量子ドット、ナノ粒子、または酵素である、請求項１１２に記載の方法。
【請求項１１４】
前記細胞が、ヒト被験体体内に存在し、前記接触させるステップが、前記抗体またはその断片を前記被験体に投与するステップを含む、請求項９９に記載の方法。
【請求項１１５】
前記細胞が、単離組織試料中または単離細胞懸濁液中に存在する、請求項９９に記載の方法。
【請求項１１６】
哺乳動物における癌を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、前記抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる、方法。
【請求項１１７】
哺乳動物における癌を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン抗体もしくはその断片、毒素、または化学療法剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、前記抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる、方法。
【請求項１１８】
哺乳動物における癌を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン抗体またはその断片および薬学的に許容される担体を投与するステップと、前記哺乳動物を放射線療法でさらに治療するステップとを含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、前記抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる、方法。
【請求項１１９】
哺乳動物における癌を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、配列番号４のタンパク質に特異的に結合する抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含む、方法。
【請求項１２０】
哺乳動物における癌を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン抗体もしくはその断片、毒素、または化学療法剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗体またはその断片が、配列番号４のタンパク質に特異的に結合する、方法。
【請求項１２１】
哺乳動物における癌を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量

の抗ヌクレオリン抗体またはその断片および薬学的に許容される担体を投与するステップと、前記哺乳動物を放射線療法でさらに治療するステップとを含み、前記抗体またはその断片が、配列番号４のタンパク質に特異的に結合する、方法。

【請求項１２２】

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項１１６から１２１に記載の方法。

【請求項１２３】

前記抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である、請求項１１６から１２１に記載の方法。

【請求項１２４】

前記抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である、請求項１１６から１２１に記載の方法。

【請求項１２５】

前記抗ヌクレオリンモノクローナル抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である、請求項１１６から１２１に記載の方法。

【請求項１２６】

前記毒素が、ジフテリア毒素、外毒素Ａ鎖、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシンＡ鎖、アルファ－サルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ジアンチンタンパク質、ｐｈｙｔｏｌａｃａ ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質、ブタクサ抗ウイルス性タンパク質、ｍｏｍｏｒｄｉｃａ ｃｈａｒａｎｔｉａ阻害剤、クルシン、クロチン、ｓａｐａｏｎａｒｉａ ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、カリケアマイシン、またはトリコテセン毒素である、請求項１１６から１２１に記載の方法。

【請求項１２７】

前記化学療法剤が、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞骨格破壊剤、エポチロン、トポイソメラーゼＩ阻害剤、トポイソメラーゼＩＩ阻害剤、ヌクレオシド類似体もしくはヌクレオチド類似体、前駆体類似体、ペプチド抗生物質、白金ベースの薬剤、レチノイド、ビンカアルカロイド、またはこれらの誘導体である、請求項１１６から１２１に記載の方法。

【請求項１２８】

前記化学療法剤が、アクチノマイシン－Ｄ、ａｌｌ－ｔｒａｎｓレチノイン酸、アザシチジン、アドリアマイシン、アザチオプリン、ブレオマイシン、カンプトテシン、カルボプラチン、カペシタビン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エポチロン、エトポシド、フルオロウラシル、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、過酸化水素、イダルビシン、イマチニブ、メクロレタミン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシンＣ、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、バルルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、またはビノレルビンである、請求項１１６から１２１に記載の方法。

【請求項１２９】

ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも５０％を死滅させる、抗ヌクレオリン剤。

【請求項１３０】

ＭＣＦ－７細胞およびＭＣＦ１０Ａ細胞の個別の集団および熱不活化血清と共に７２または９６時間にわたりインキュベートすると、ＭＣＦ１０Ａ細胞より多くのＭＣＦ－７細胞を死滅させる、抗ヌクレオリン剤。

【請求項１３１】

ＭＣＦ－７細胞およびＭＣＦ１０Ａ細胞の個別の集団およびヒトＡＢ血清と共に９６時間にわたりインキュベートすると、ＭＣＦ１０Ａ細胞より多くのＭＣＦ－７細胞を死滅させる、抗ヌクレオリン剤。

【請求項１３２】
配列番号４のタンパク質に特異的に結合し、それらの細胞表面においてヌクレオリンを発現する１または複数の癌細胞を阻害するかまたは死滅させる、抗ヌクレオリン剤。
【請求項１３３】
ヒトに対して実質的に非免疫原性である、請求項１２９から１３２に記載の抗ヌクレオリン剤。
【請求項１３４】
１または複数の前癌性細胞における細胞表面ヌクレオリン発現の増大を検出することにより、被験体が癌を発生させる可能性を決定する方法。
【請求項１３５】
Ｆａｂ断片、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、もしくはＦｖ断片；ダイアボディー；直鎖状抗体；単鎖抗体；または抗体断片から形成される多重特異性抗体である、前記請求項のいずれかに記載の抗体。
【請求項１３６】
Ｆａｂ断片、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、もしくはＦｖ断片；ダイアボディー；直鎖状抗体；単鎖抗体；または抗体断片から形成される多重特異性抗体である抗体断片の使用を含む、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
相互参照
この出願は、２００９年１１月１７日に出願された米国仮出願第６１／２６１，９０９号（これは、その全体が参考として本明細書に援用される）への優先権の利益を主張する。
【０００２】
連邦政府によって資金援助を受けた研究についての声明
本発明は、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈによって付与された助成金番号ＮＣＩ ＣＡ１０９２５４－０４Ｓ１の下、米国政府の支援によってなされた。米国政府は、本発明に権利を有しうる。
【０００３】
本発明は概して、細胞生物学および免疫学の分野に関する。より具体的に述べると、本発明は、ヒトヌクレオリン（ＮＣＬ）に対するヒトモノクローナル抗体の生成および使用に関する方法および組成物を対象とする。
【背景技術】
【０００４】
抗体は、「生物学的薬剤」として公知の薬剤クラスである。抗体の供給源は、ヒト血清またはウマ血清など、ポリクローナルの供給源の場合もあり、モノクローナルの供給源（単一細胞によるクローン）に由来する場合もある。特異的な抗原結合を制御および選択する技術的能力を伴うことにより、モノクローナル抗体は、劇的な治療利益をもたらしている。しかし、ある標的に対して特異的な抗体を生成させることが難しいために、成功は限定されたものであり、治療剤および診断剤への可能性は、大半が依然として手つかずのままである。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
ヒト治療用のモノクローナル抗体の開発に対する１つの障害は、一般にマウス、ラット、およびウサギにおいて作製されるこのような抗体を「ヒト化」する必要性である。定常領域がヒト化されないこのような抗体をヒト患者に投与すると、ヒト患者は、「血清病」を患う可能性があるが、これは、レシピエントにより、非ヒト抗体配列に対する内因性免

疫反応が引き起こされることを意味する。研究用動物において生成されたモノクローナル抗体をヒト化すれば、この問題を回避することができる。しかし、抗体をヒト化するための時間的コストおよび費用は多大なものとなりうる。

【０００６】

ヌクレオリンは、ヒト慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）細胞、ヒト急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）細胞、乳癌の一部の形態、ならびに他の腫瘍の細胞表面において発現する。ヌクレオリンはそれ自体、抗体を含めた治療剤を標的化するのに有望な腫瘍抗原を構成する。

【課題を解決するための手段】

【０００７】

本発明の一態様では、ヒトヌクレオリンに結合する抗体を分泌する不死化ヒトＢ細胞を生成する方法であって、ＩｇＭ陽性ヒトＢ細胞の集団を得るステップと、前記集団を、前記ヒトＢ細胞を不死化させるエプスタイン－バーウイルス（ＥＢＶ）、およびＩｇＭからＩｇＧへの免疫グロブリンアイソタイプのクラススイッチを誘導するサイトカイン／増殖因子／シグナル伝達剤カクテルと接触させるステップと、前記不死化ならびに免疫グロブリンアイソタイプのクラススイッチを支援する条件下で細胞を培養するステップとを含む方法が提供される。一実施形態では、該方法が、ヒトヌクレオリンに対する抗体を発現する不死化ヒトＢ細胞を選択するステップをさらに含む。別の実施形態では、選択するステップが、不死化Ｂ細胞の培養培地上清に対して実施されるイムノアッセイを含む。別の実施形態では、サイトカインカクテルが、共起刺激シグナルをヒトＢ細胞に送達する作用物質を含む。別の実施形態では、サイトカインカクテルが、抗ＩｇＭ Ｆ（ａｂ’）$_2$；インターロイキン（ＩＬ）－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、ＩＮＦα、ＢＡＦＦ、可溶性ＣＤ４０Ｌを含む。別の実施形態では、ＩｇＭ陽性ヒトＢ細胞の集団を、末梢血、扁桃腺、骨髄、脾臓、リンパ節、臍帯血、肝臓、アフェレーシス手順、またはバフィコートから得る。別の実施形態では、ステップ（ｄ）の不死化ヒトＢ細胞から、重鎖および／または軽鎖の全体をコードする核酸を単離するステップをさらに含む。別の実施形態では、ステップ（ｄ）の不死化ヒトＢ細胞から、重鎖および／または軽鎖の抗原結合領域をコードする核酸を単離するステップをさらに含む。別の実施形態では、該方法が、前記核酸を、重鎖および／または軽鎖のフレームワーク領域をコードする核酸へとクローニングするステップをさらに含む。別の実施形態では、前記集団を接触させるステップが、感染時におけるＥＢＶの濃縮ステップ、遠心分離ステップ、またはこれらの両方をさらに含む。別の実施形態では、該方法が、ステップ（ｃ）の後に、前記ヒトＢ細胞集団を凍結させるステップをさらに含む。別の実施形態では、ステップ（ｂ）（ｉｉ）の約０～９６時間後に、前記集団を、サイトカイン／増殖因子／シグナル伝達剤カクテルと接触させるステップを実施する。別の実施形態では、ステップ（ｂ）（ｉｉ）の約１６～２０時間後に、前記集団を、サイトカイン／増殖因子／シグナル伝達剤カクテルと接触させるステップを実施する。別の実施形態では、前記集団のうちの約５０％～９９％を、ＥＢＶ感染により不死化させる。別の実施形態では、前記集団のうちの約９５％～９９％を、ＥＢＶ感染により不死化させる。別の実施形態では、ヒトヌクレオリンに対する抗体を発現する不死化ヒトＢ細胞を選択するステップを、感染の１～４週間後に行う。別の実施形態では、ヒトヌクレオリンに対する抗体を発現する不死化ヒトＢ細胞を選択するステップを、感染の２～３週間後に行う。別の実施形態では、ヒトヌクレオリンに対する抗体を発現する不死化ヒトＢ細胞を選択するステップを、凍結保存した不死化Ｂ細胞を融解させた後に、かつ／または前記不死化Ｂ細胞に由来する凍結保存した培養培地上清を融解させた後に行う。別の実施形態では、Ｂ細胞が、抗原ナイーブ細胞である。別の実施形態では、Ｂ細胞が、抗原経験（ａｎｔｉｇｅｎ ｅｘｐｅｒｉｅｎｃｅｄ）細胞である。

【０００８】

別の態様では、本発明が、ヒトヌクレオリンに結合するＩｇＧ抗体を発現する不死化ヒトＢ細胞を提供する。一実施形態では、不死化ヒトＢ細胞が、Ｔ－５Ｄ１、Ｖ－３Ｈ１１（３Ｇ５）、Ｔ－２Ｄ３、Ｔ－７Ｇ７（１Ｈ９）、Ｔ－２Ｈ３、Ｔ－９Ｆ９、Ｔ－８Ｇ４

、またはＴ－Ｐ１Ｃ６と命名されている。

【０００９】

別の態様では、本発明が、配列番号２のタンパク質に結合するＩｇＧ抗体またはその断片を発現する不死化ヒトＢ細胞を提供する。一実施形態では、ＩｇＧ抗体が、ＩｇＧ１抗体、ＩｇＧ２抗体、ＩｇＧ３抗体、またはＩｇＧ４抗体である。別の実施形態では、ＩｇＧ抗体が、ＩｇＧ１抗体である。別の実施形態では、ＩｇＧ抗体が、カッパ軽鎖を含む。別の実施形態では、ＩｇＧ抗体が、ラムダ軽鎖を含む。別の実施形態では、Ｂ細胞を、ＥＢＶにより不死化させる。別の実施形態では、抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも３０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも４０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも５０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも６０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも７０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも８０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも９０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１００％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも１０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも３０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも４０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも５０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも６０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも７０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のう

ちの少なくとも８０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも９０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも１００％を死滅させる。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインに結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインを不活化させる。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体依存性細胞傷害作用を誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体非依存性細胞傷害作用を誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、接触時に癌細胞においてアポトーシスを誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、ＡＭＬ癌細胞、ＣＬＬ癌細胞、または乳癌細胞を阻害するかまたは死滅させる。別の実施形態では、単離モノクローナル抗体またはその断片が、癌細胞におけるＢＣＬ－２レベルを低減する。

【００１０】

別の態様では、本発明が、配列番号１によりコードされるタンパク質に結合するＩｇＧ抗体またはその断片を発現する、不死化ヒトＢ細胞を提供する。一実施形態では、ＩｇＧ抗体が、ＩｇＧ１抗体、ＩｇＧ２抗体、ＩｇＧ３抗体、またはＩｇＧ４抗体である。別の実施形態では、ＩｇＧ抗体が、ＩｇＧ１抗体である。別の実施形態では、ＩｇＧ抗体が、カッパ軽鎖を含む。別の実施形態では、ＩｇＧ抗体が、ラムダ軽鎖を含む。別の実施形態では、Ｂ細胞を、ＥＢＶにより不死化させる。別の実施形態では、抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。ヒトに対して実質的に非免疫原性である、請求項３３に記載の単離抗体またはその断片。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも３０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも４０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも５０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも６０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも７０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも８０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも９０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１００％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも１０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも２０％

を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも３０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも４０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも５０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも６０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも７０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも８０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも９０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも１００％を死滅させる。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインに結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインを不活化させる。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体依存性細胞傷害作用を誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体非依存性細胞傷害作用を誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、接触時に癌細胞においてアポトーシスを誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、ＡＭＬ癌細胞、ＣＬＬ癌細胞、または乳癌細胞を阻害するかまたは死滅させる。別の実施形態では、単離モノクローナル抗体またはその断片が、癌細胞におけるＢＣＬ－２レベルを低減する。

【００１１】

別の態様では、本発明が、配列番号４を含むタンパク質に結合するＩｇＧ抗体またはその断片を発現する、不死化ヒトＢ細胞を提供する。一実施形態では、ＩｇＧ抗体が、ＩｇＧ１抗体、ＩｇＧ２抗体、ＩｇＧ３抗体、またはＩｇＧ４抗体である。別の実施形態では、ＩｇＧ抗体が、ＩｇＧ１抗体である。別の実施形態では、ＩｇＧ抗体が、カッパ軽鎖を含む。別の実施形態では、ＩｇＧ抗体が、ラムダ軽鎖を含む。別の実施形態では、Ｂ細胞を、ＥＢＶにより不死化させる。別の実施形態では、モノクローナル抗体またはその断片である、請求項３３に記載の単離抗体またはその断片。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも３０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも４０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも５０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも６０％を死滅させる。別の実施形態で

は、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも７０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも８０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも９０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１００％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも１０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも３０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも４０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも５０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも６０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも７０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも８０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも９０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも１００％を死滅させる。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインに結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインを不活化させる。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体依存性細胞傷害作用を誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体非依存性細胞傷害作用を誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、接触時に癌細胞においてアポトーシスを誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、ＡＭＬ癌細胞、ＣＬＬ癌細胞、または乳癌細胞を阻害するかまたは死滅させる。別の実施形態では、単離モノクローナル抗体またはその断片が、癌細胞におけるＢＣＬ－２レベルを低減する。

【００１２】

別の態様では、本発明が、配列番号３によりコードされるタンパク質に結合するＩｇＧ抗体またはその断片を発現する、不死化ヒトＢ細胞を提供する。一実施形態では、ＩｇＧ抗体が、ＩｇＧ１抗体、ＩｇＧ２抗体、ＩｇＧ３抗体、またはＩｇＧ４抗体である。別の実施形態では、ＩｇＧ抗体が、ＩｇＧ１抗体である。別の実施形態では、ＩｇＧ抗体が、カッパ軽鎖を含む。別の実施形態では、ＩｇＧ抗体が、ラムダ軽鎖を含む。別の実施形態では、Ｂ細胞を、ＥＢＶにより不死化させる。別の実施形態では、抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清

と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインに結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインを不活化させる。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体依存性細胞傷害作用を誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体非依存性細胞傷害作用を誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、接触時に癌細胞においてアポトーシスを誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、ＡＭＬ癌細胞、ＣＬＬ癌細胞、または乳癌細胞を阻害するかまたは死滅させる。別の実施形態では、単離モノクローナル抗体またはその断片が、癌細胞におけるＢＣＬ－２レベルを低減する。

【００１３】

別の態様では、本発明が、配列番号４のタンパク質に特異的に結合する、単離ヒトモノクローナル抗体またはその断片を提供する。一実施形態では、抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも３０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも４０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも５０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも６０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも７０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも８０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも９０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１００％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも１０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも３０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも４０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも５０％を死滅させる。別の実施形

態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも６０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも７０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも８０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも９０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも１００％を死滅させる。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインに結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインを不活化させる。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体依存性細胞傷害作用を誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体非依存性細胞傷害作用を誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、接触時に癌細胞においてアポトーシスを誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、ＡＭＬ癌細胞、ＣＬＬ癌細胞、または乳癌細胞を阻害するかまたは死滅させる。別の実施形態では、単離モノクローナル抗体またはその断片が、癌細胞におけるＢＣＬ－２レベルを低減する。

【００１４】

別の態様では、本発明が、ヒトヌクレオリンタンパク質に特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる、単離抗体またはその断片を提供する。一実施形態では、前記ヒトヌクレオリンのアミノ酸配列が、配列番号２を含む。別の実施形態では、抗体またはその断片が、配列番号２のアミノ酸残基１～２８３からなるアミノ酸配列に結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインに結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインを不活化させる。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、診断剤または治療剤に連結されている。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体依存性細胞傷害作用を呈示する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体非依存性細胞傷害作用を呈示する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、接触時に癌細胞においてアポトーシスを誘導する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ＡＭＬ癌細胞、ＣＬＬ癌細胞、または乳癌細胞を阻害するかまたは死滅させる。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞におけるＢＣＬ－２レベルを低減する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、診断剤に連結されている。別の実施形態では、診断剤が、放射性核種、フルオロフォア、化学発光化合物、蛍光化合物、または酵素である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、治療剤に連結される。別の実施形態では、治療剤が、放射性核種、毒素、または化学療法剤部分（ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　ｍｏｉｅｔｙ）である。

【００１５】

別の態様では、本発明が、ヒトヌクレオリンタンパク質に特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、ＭＶ４－１１細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、前記ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも１０～１００％（前記ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、または１００％など）を死滅させる、単離抗体またはその断片を提供する。別の

実施形態では、前記ヒトヌクレオリンのアミノ酸配列が、配列番号２を含む。別の実施形態では、抗体またはその断片が、配列番号２のアミノ酸残基１～２８３からなるアミノ酸配列に結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインに結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインを不活化させる。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、診断剤または治療剤に連結される。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体依存性細胞傷害作用を呈示する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体非依存性細胞傷害作用を呈示する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、接触時に癌細胞においてアポトーシスを誘導する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ＡＭＬ癌細胞、ＣＬＬ癌細胞、または乳癌細胞を阻害するかまたは死滅させる。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞におけるＢＣＬ－２レベルを低減する。別の実施形態では、前記抗体またはその断片が、診断剤に連結される。別の実施形態では、診断剤が、放射性核種、フルオロフォア、化学発光化合物、蛍光化合物、または酵素である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、治療剤に連結される。別の実施形態では、治療剤が、放射性核種、毒素、または化学療法剤部分である。

【００１６】

別の態様では、本発明が、ヒトヌクレオリンタンパク質に特異的に結合する１または複数の単離抗体またはそれらの断片を含む抗ヌクレオリン組成物であって、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８～９６時間（４８、７２、または９６時間など）にわたりインキュベートすると、前記１または複数の抗体が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１０～１００％（１０、２０、３０、４０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、または１００％など）を死滅させる、抗ヌクレオリン組成物を提供する。一実施形態では、１または複数の単離抗体またはそれらの断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。別の実施形態では、１または複数の単離抗体またはそれらの断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、１または複数の単離抗体またはそれらの断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、１または複数の単離抗体またはそれらの断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインに結合する。別の実施形態では、１または複数の単離抗体またはそれらの断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインを不活化させる。別の実施形態では、前記ヒトヌクレオリンのアミノ酸配列が、配列番号２を含む。別の実施形態では、１または複数の単離抗体またはそれらの断片が、配列番号４に結合する。別の実施形態では、該抗ヌクレオリン組成物が、放射性核種、フルオロフォア、化学発光化合物、蛍光化合物、酵素、毒素、または化学療法剤をさらに含む。別の実施形態では、放射性核種、フルオロフォア、化学発光化合物、蛍光化合物、酵素、毒素、または化学療法剤が、前記１または複数の単離抗体またはそれらの断片にコンジュゲートされている。別の実施形態では、該抗ヌクレオリン組成物が、前記ヒトヌクレオリンタンパク質に特異的に結合する２つ以上の単離抗体またはそれらの断片を含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、前記１または複数の抗体が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ヒトヌクレオリンタンパク質に特異的に結合する３つ以上の単離抗体またはそれらの断片を含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、前記１または複数の抗体が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる。

【００１７】

本発明の別の態様では、ヌクレオリンをその表面に発現する細胞を阻害するかまたは死滅させる方法であって、前記細胞を、ヒトヌクレオリンに結合する抗体またはその断片と接触させるステップを含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、前記抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの

少なくとも２０％を死滅させる方法が提供される。一実施形態では、抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、配列番号２に結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、配列番号１によりコードされるアミノ酸配列に結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、配列番号４に結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、配列番号３によりコードされるアミノ酸配列に結合する。別の実施形態では、細胞が、癌細胞である。別の実施形態では、癌細胞が、肺癌細胞、乳癌細胞、前立腺癌細胞、結腸癌細胞、膵臓癌細胞、腎細胞癌細胞、卵巣癌細胞、白血病細胞、黒色腫細胞、膠芽腫細胞、神経芽腫細胞、肉腫細胞、または胃癌細胞である。別の実施形態では、細胞が、免疫細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、リンパ球、樹状細胞、末梢血単球、マクロファージ、または神経膠細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、活性化免疫細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、活性化Ｂ細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、メモリーＢ細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、活性化Ｔ細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、活性化ＣＤ４＋Ｔ細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、活性化ＣＤ８＋Ｔ細胞である。別の実施形態では、細胞が、血管平滑筋細胞または内皮細胞である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、診断剤に連結されている。別の実施形態では、治療剤が、放射性核種、毒素、または化学療法剤である。別の実施形態では、阻害するかまたは死滅させることが、前記細胞においてアポトーシスを誘導するステップを含む。別の実施形態では、細胞が、ヒト被験体体内に存在し、前記接触させるステップが、前記抗体またはその断片を前記被験体に投与するステップを含む。別の実施形態では、該方法が、前記細胞を、少なくとも１つのさらなる阻害剤または治療と接触させるステップをさらに含む。別の実施形態では、さらなる治療が、手術、放射線療法、化学療法、毒素療法、免疫療法、ホルモン療法、抗血管新生療法、もしくは遺伝子療法、または他の生物学的療法（ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　ｔｈｅｒａｐｙ）のうちの１または複数を含む。別の実施形態では、さらなる阻害剤が、放射性核種、化学療法剤、毒素、免疫療法剤、ホルモン、核酸、またはポリペプチドのうちの１または複数を含む。別の実施形態では、毒素が、ジフテリア毒素、外毒素Ａ鎖、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシン（ｍｏｄｅｃｃｉｎ）Ａ鎖、アルファ－サルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ　ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ジアンチン（ｄｉａｎｔｈｉｎ）タンパク質、ｐｈｙｔｏｌａｃａ　ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質、ブタクサ抗ウイルス性タンパク質、ｍｏｍｏｒｄｉｃａ　ｃｈａｒａｎｔｉａ阻害剤、クルシン、クロチン、ｓａｐａｏｎａｒｉａ　ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ阻害剤、ゲロニン（ｇｅｌｏｎｉｎ）、ミトゲリン（ｍｉｔｏｇｅｌｌｉｎ）、レストリクトシン（ｒｅｓｔｒｉｃｔｏｃｉｎ）、フェノマイシン（ｐｈｅｎｏｍｙｃｉｎ）、エノマイシン（ｅｎｏｍｙｃｉｎ）、カリケアマイシン（ｃａｌｉｃｈｅａｍｉｃｉｎｓ）、またはトリコテセン毒素（ｔｒｉｃｏｔｈｅｃｅｎｅｓ　ｔｏｘｉｎ）である。別の実施形態では、化学療法剤が、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞骨格破壊剤、エポチロン、トポイソメラーゼＩ阻害剤、トポイソメラーゼＩＩ阻害剤、ヌクレオシド類似体もしくはヌクレオチド類似体、前駆体類似体、ペプチド抗生物質、白金ベースの薬剤、レチノイド、ビンカアルカロイド、またはこれらの誘導体である。別の実施形態では、前記化学療法剤が、アクチノマイシン－Ｄ、ａｌｌ－ｔｒａｎｓレチノイン酸、アザシチジン、アドリアマイシン、アザチオプリン、ブレオマイシン、カンプトテシン、カルボプラチン、カペシタビン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エポチロン、エトポシド、フルオロウラシル、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、過酸化水素、イダルビシン、イマチニブ、メクロレタミン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシンＣ、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、バルルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、またはビノレルビンである。

【００１８】

本発明の別の態様では、ヌクレオリンをその表面に発現する細胞を検出する方法であって、前記細胞を、前記ヌクレオリンに免疫学的に結合するヒト抗体またはその断片と接触させるステップを含む方法が提供される。一実施形態では、細胞が、癌細胞、免疫細胞、ヌクレオリンをその表面に発現する血管平滑筋細胞、ヌクレオリンをその表面に発現する内皮細胞、またはウイルスに感染した細胞である。別の実施形態では、細胞が、ヌクレオリンをその表面に発現する前癌性細胞である。別の実施形態では、癌細胞が、肺癌細胞、乳癌細胞、前立腺癌細胞、結腸癌細胞、膵臓癌細胞、腎細胞癌細胞、卵巣癌細胞、白血病細胞、黒色腫細胞、膠芽腫細胞、神経芽腫細胞、肉腫細胞、または胃癌細胞からなる群から選択される。別の実施形態では、免疫細胞が、リンパ球、樹状細胞、末梢血単球、マクロファージ、または神経膠細胞である。別の実施形態では、細胞が、免疫細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、活性化免疫細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、活性化Ｂ細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、メモリーＢ細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、活性化Ｔ細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、活性化ＣＤ４＋Ｔ細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、活性化ＣＤ８＋Ｔ細胞である。別の実施形態では、細胞が、血管平滑筋細胞または内皮細胞である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、診断剤に連結されている。別の実施形態では、診断剤が、放射性核種、フルオロフォア、化学発光化合物、蛍光化合物、量子ドット、ナノ粒子、または酵素である。別の実施形態では、細胞が、ヒト被験体体内に存在し、前記接触させるステップが、前記抗体またはその断片を前記被験体に投与するステップを含む。別の実施形態では、細胞が、単離組織試料中または単離細胞懸濁液中に存在する。

【００１９】

別の態様では、本発明が、哺乳動物における癌を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間（４８、７２、または９６時間など）にわたりインキュベートすると、前記抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１０～１００％（１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、または１００％など）を死滅させる方法を提供する。一実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、哺乳動物において癌を治療することが、腫瘍による低酸素状態（ｈｐｏｘｉａ）を治療するステップを含む。別の実施形態では、哺乳動物において癌を治療することが、腫瘍による血管新生を阻害するステップを含む。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリンモノクローナル抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。別の実施形態では、毒素が、ジフテリア毒素、外毒素Ａ鎖、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシンＡ鎖、アルファ－サルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ジアンチンタンパク質、Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ（ｐｈｙｔｏｌａｃａ） ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質、ブタクサ抗ウイルス性タンパク質、Ｍｏｍｏｒｄｉｃａ（ｍｏｍｏｒｄｉｃａ） ｃｈａｒａｎｔｉａ阻害剤、クルシン、クロチン、Ｓａｐａｏｎａｒｉａ（ｓａｐａｏｎａｒｉａ） ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、カリケアマイシン、またはトリコテセン毒素である。別の実施形態では、化学療法剤が、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞骨格破壊剤、エポチロン、トポイソメラーゼＩ阻害剤、トポイソメラーゼＩＩ阻害剤、ヌクレオシド類似体もしくはヌクレオチド類似体、前駆体類似体、ペプチド抗生物質、白金ベースの薬剤、レチノイド、ビンカアルカロイド、またはこれらの誘導体である。別の実施形態では、化学療法剤が、アクチノマイシン－Ｄ、ａｌｌ－ｔｒａｎｓレチノイン酸、アザシチジン、アドリアマイシン、アザチオプリン、ブレオマイシン、カンプトテシン、カルボプラチン、カペシタビン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エポチロン、エトポシド、フルオ

ロウラシル、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、過酸化水素、イダルビシン、イマチニブ、メクロレタミン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシンＣ、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、バルルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、またはビノレルビンである。

【００２０】

別の態様では、本発明が、哺乳動物における癌を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン抗体またはその断片、毒素または化学療法剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間（４８、７２、または９６時間など）にわたりインキュベートすると、前記抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１０～１００％（１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、または１００％など）を死滅させる方法を提供する。一実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、哺乳動物において癌を治療することが、腫瘍による低酸素状態（ｈｐｏｘｉａ）を治療するステップを含む。別の実施形態では、哺乳動物において癌を治療することが、腫瘍による血管新生を阻害するステップを含む。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリンモノクローナル抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。別の実施形態では、毒素が、ジフテリア毒素、外毒素Ａ鎖、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシンＡ鎖、アルファ－サルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ジアンチンタンパク質、Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ（ｐｈｙｔｏｌａｃａ） ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質、ブタクサ抗ウイルス性タンパク質、Ｍｏｍｏｒｄｉｃａ（ｍｏｍｏｒｄｉｃａ） ｃｈａｒａｎｔｉａ阻害剤、クルシン、クロチン、Ｓａｐａｏｎａｒｉａ（ｓａｐａｏｎａｒｉａ） ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、カリケアマイシン、またはトリコテセン毒素である。別の実施形態では、化学療法剤が、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞骨格破壊剤、エポチロン、トポイソメラーゼＩ阻害剤、トポイソメラーゼＩＩ阻害剤、ヌクレオシド類似体もしくはヌクレオチド類似体、前駆体類似体、ペプチド抗生物質、白金ベースの薬剤、レチノイド、ビンカアルカロイド、またはこれらの誘導体である。別の実施形態では、化学療法剤が、アクチノマイシン－Ｄ、ａｌｌ－ｔｒａｎｓレチノイン酸、アザシチジン、アドリアマイシン、アザチオプリン、ブレオマイシン、カンプトテシン、カルボプラチン、カペシタビン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エポチロン、エトポシド、フルオロウラシル、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、過酸化水素、イダルビシン、イマチニブ、メクロレタミン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシンＣ、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、バルルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、またはビノレルビンである。

【００２１】

別の態様では、本発明が、哺乳動物における癌を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン抗体またはその断片ならびに薬学的に許容される担体を投与するステップと、前記哺乳動物を放射線療法でさらに治療するステップとを含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８～９６時間（４８、７２、または９６時間など）にわたりインキュベートすると、前記抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１０～１００％（１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、または１００％など）を死滅させる方法を提供する。一実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、哺乳動物において癌を治療することが、腫瘍による低酸素状態（ｈｐｏｘｉａ）を治療するステップを含む。別の実施形態で

は、哺乳動物において癌を治療することが、腫瘍による血管新生を阻害するステップを含む。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。別の実施形態では、毒素が、ジフテリア毒素、外毒素Ａ鎖、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシンＡ鎖、アルファ－サルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ジアンチンタンパク質、Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ（ｐｈｙｔｏｌａｃａ）ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質、ブタクサ抗ウイルス性タンパク質、Ｍｏｍｏｒｄｉｃａ（ｍｏｍｏｒｄｉｃａ）ｃｈａｒａｎｔｉａ阻害剤、クルシン、クロチン、Ｓａｐａｏｎａｒｉａ（ｓａｐａｏｎａｒｉａ）ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、カリケアマイシン、またはトリコテセン毒素である。別の実施形態では、化学療法剤が、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞骨格破壊剤、エポチロン、トポイソメラーゼＩ阻害剤、トポイソメラーゼＩＩ阻害剤、ヌクレオシド類似体もしくはヌクレオチド類似体、前駆体類似体、ペプチド抗生物質、白金ベースの薬剤、レチノイド、ビンカアルカロイド、またはこれらの誘導体である。別の実施形態では、化学療法剤が、アクチノマイシン－Ｄ、ａｌｌ－ｔｒａｎｓレチノイン酸、アザシチジン、アドリアマイシン、アザチオプリン、ブレオマイシン、カンプトテシン、カルボプラチン、カペシタビン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エポチロン、エトポシド、フルオロウラシル、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、過酸化水素、イダルビシン、イマチニブ、メクロレタミン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシンＣ、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、バルルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、またはビノレルビンである。

【００２２】

別の態様では、本発明が、哺乳動物における癌を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤ならびに薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、配列番号４のタンパク質に特異的に結合する抗体またはその断片を含む方法を提供する。一実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、哺乳動物において癌を治療することが、腫瘍による低酸素状態を治療するステップを含む。別の実施形態では、哺乳動物において癌を治療することが、腫瘍による血管新生を阻害するステップを含む。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリンモノクローナル抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。別の実施形態では、毒素が、ジフテリア毒素、外毒素Ａ鎖、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシンＡ鎖、アルファ－サルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ジアンチンタンパク質、Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ（ｐｈｙｔｏｌａｃａ）ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質、ブタクサ抗ウイルス性タンパク質、Ｍｏｍｏｒｄｉｃａ（ｍｏｍｏｒｄｉｃａ）ｃｈａｒａｎｔｉａ阻害剤、クルシン、クロチン、Ｓａｐａｏｎａｒｉａ（ｓａｐａｏｎａｒｉａ）ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、カリケアマイシン、またはトリコテセン毒素である。別の実施形態では、化学療法剤が、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞骨格破壊剤、エポチロン、トポイソメラーゼＩ阻害剤、トポイソメラーゼＩＩ阻害剤、ヌクレオシド類似体もしくはヌクレオチド類似体、前駆体類似体、ペプチド抗生物質、白金ベースの薬剤、レチノイド、ビンカアルカロイド、またはこれらの誘導体である。別の実施形態では、化学療法剤が、アクチノマイシン－Ｄ、ａｌｌ－ｔｒａｎｓレチノイン酸、アザシチジン、アドリアマイシン、アザチオプリン、ブレオマイシン、カンプトテシン、カルボプラチン、カペシタビン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホス

ファミド、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エポチロン、エトポシド、フルオロウラシル、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、過酸化水素、イダルビシン、イマチニブ、メクロレタミン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシンＣ、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、バルルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、またはビノレルビンである。

【００２３】

哺乳動物における癌を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン抗体もしくはその断片、毒素、または化学療法剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗体またはその断片が、配列番号４のタンパク質に特異的に結合する方法。一実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、哺乳動物において癌を治療することが、腫瘍による低酸素状態（ｈｐｏｘｉａ）を治療するステップを含む。別の実施形態では、哺乳動物において癌を治療することが、腫瘍による血管新生を阻害するステップを含む。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリンモノクローナル抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。別の実施形態では、毒素が、ジフテリア毒素、外毒素Ａ鎖、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシンＡ鎖、アルファ－サルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ジアンチンタンパク質、Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ（ｐｈｙｔｏｌａｃａ）ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質、ブタクサ抗ウイルス性タンパク質、Ｍｏｍｏｒｄｉｃａ（ｍｏｍｏｒｄｉｃａ）ｃｈａｒａｎｔｉａ阻害剤、クルシン、クロチン、Ｓａｐａｏｎａｒｉａ（ｓａｐａｏｎａｒｉａ）ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、カリケアマイシン、またはトリコテセン毒素である。別の実施形態では、化学療法剤が、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞骨格破壊剤、エポチロン、トポイソメラーゼＩ阻害剤、トポイソメラーゼＩＩ阻害剤、ヌクレオシド類似体もしくはヌクレオチド類似体、前駆体類似体、ペプチド抗生物質、白金ベースの薬剤、レチノイド、ビンカアルカロイド、またはこれらの誘導体である。別の実施形態では、化学療法剤が、アクチノマイシン－Ｄ、ａｌｌ－ｔｒａｎｓレチノイン酸、アザシチジン、アドリアマイシン、アザチオプリン、ブレオマイシン、カンプトテシン、カルボプラチン、カペシタビン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エポチロン、エトポシド、フルオロウラシル、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、過酸化水素、イダルビシン、イマチニブ、メクロレタミン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシンＣ、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、バルルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、またはビノレルビンである。

【００２４】

別の態様では、本発明が、哺乳動物における癌を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン抗体またはその断片および薬学的に許容される担体を投与するステップと、前記哺乳動物を放射線療法でさらに治療するステップとを含み、前記抗体またはその断片が、配列番号４のタンパク質に特異的に結合する方法を提供する。一実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、哺乳動物において癌を治療することが、腫瘍による低酸素状態（ｈｐｏｘｉａ）を治療するステップを含む。別の実施形態では、哺乳動物において癌を治療することが、腫瘍による血管新生を阻害するステップを含む。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリンモノクロー

ナル抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。別の実施形態では、毒素が、ジフテリア毒素、外毒素Ａ鎖、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシンＡ鎖、アルファ－サルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ジアンチンタンパク質、Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ（ｐｈｙｔｏｌａｃａ） ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質、ブタクサ抗ウイルス性タンパク質、Ｍｏｍｏｒｄｉｃａ（ｍｏｍｏｒｄｉｃａ） ｃｈａｒａｎｔｉａ阻害剤、クルシン、クロチン、Ｓａｐａｏｎａｒｉａ（ｓａｐａｏｎａｒｉａ） ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、カリケアマイシン、またはトリコテセン毒素である。別の実施形態では、化学療法剤が、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞骨格破壊剤、エポチロン、トポイソメラーゼＩ阻害剤、トポイソメラーゼＩＩ阻害剤、ヌクレオシド類似体もしくはヌクレオチド類似体、前駆体類似体、ペプチド抗生物質、白金ベースの薬剤、レチノイド、ビンカアルカロイド、またはこれらの誘導体である。別の実施形態では、化学療法剤が、アクチノマイシン－Ｄ、ａｌｌ－ｔｒａｎｓレチノイン酸、アザシチジン、アドリアマイシン、アザチオプリン、ブレオマイシン、カンプトテシン、カルボプラチン、カペシタビン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エポチロン、エトポシド、フルオロウラシル、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、過酸化水素、イダルビシン、イマチニブ、メクロレタミン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシンＣ、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、バルルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、またはビノレルビンである。

【００２５】

別の態様では、本発明が、哺乳動物における自己免疫疾患を治療する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間（４８、７２、または９６時間など）にわたりインキュベートすると、前記抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１０～１００％（１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、または１００％など）を死滅させる方法を提供する。一実施形態では、自己免疫疾患が、円形脱毛症（ａｌｏｐｅｃｉａ ｇｒｅａｔａ）、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、喘息、自己免疫性副腎疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎および自己免疫性抗癌炎、自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスプルー－皮膚炎、慢性疲労性免疫不全症候群（ＣＦＩＤＳ）、慢性炎症性脱髄性多発性神経障害、チャーグ－ストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡、ＣＲＥＳＴ症候群、寒冷凝集素症、クローン病、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、疱疹状皮膚炎、糖尿病（例えば、１型）、好酸球性筋膜炎（ｅｏｓｉｎｏｐｈｉｌｉｃ ｆａｓｃｉｔｅｓ）、線維筋痛症－線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン－バレー症候群、橋本甲状腺炎、ヘノッホ－シェーンライン紫斑病、特発性肺線維症、特発性／自己免疫性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、ＩｇＡ性神経障害、若年性関節炎、扁平苔癬、エリテマトーデス（ｌｕｐｕｓ ｅｒｔｈｅｍａｔｏｓｕｓ）、メニエール病、混合型結合組織病、多発性硬化症、１型糖尿病または免疫媒介性糖尿病、重症筋無力症、天疱瘡関連障害（例えば、尋常性天疱瘡）、骨髄異形成症候群、悪性貧血、結節性動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性自己免疫性症候群、リウマチ性多発性筋痛、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象（Ｒａｙｎａｕｌｄ’ｓ ｐｈｅｎｏｍｅｍｏｎ）、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティッフマン症候群、全身性エリテマトーデス（ｓｙｓｔｅｍｉｃ ｌｕｐｕｓ ｅｒｙｔｈｅｍａｔｏｓｉｓ）（ＳＬＥ）、スイート症候群、スティル病、エリテマトーデス、高安動脈炎（ｔａｋａｙａｓｕ ａｒｔｅｒｉｔｉｓ）、側頭部動脈炎／巨細胞動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、血管炎、尋常性白斑、およびウェゲナー肉芽腫症である

。炎症性障害の例には、喘息、脳炎（ｅｎｃｅｐｈｉｌｉｔｉｓ）、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、アレルギー性障害、敗血症性ショック、肺線維症、未分化型脊椎関節症、未分化型関節症、関節炎、炎症性骨溶解、移植片対宿主病、蕁麻疹、またはフォークト－小柳－原田症候群（Ｖｏｇｔ－Ｋｏｙａｎａｇｉ－Ｈａｒｅｄａ ｓｙｎｄｒｏｍｅ）が含まれるがこれらに限定されない。別の実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。

【００２６】

別の態様では、本発明が、哺乳動物における自己免疫疾患を治療する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、配列番号２のタンパク質に特異的に結合する、ヒト抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含む方法を提供する。一実施形態では、自己免疫疾患が、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、喘息、自己免疫性副腎疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎および自己免疫性抗癌炎、自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスプルー－皮膚炎、慢性疲労性免疫不全症候群（ＣＦＩＤＳ）、慢性炎症性脱髄性多発性神経障害、チャーグ－ストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡、ＣＲＥＳＴ症候群、寒冷凝集素症、クローン病、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、疱疹状皮膚炎、糖尿病（例えば、１型）、好酸球性筋膜炎、線維筋痛症－線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン－バレー症候群、橋本甲状腺炎、ヘノッホ－シェーンライン紫斑病、特発性肺線維症、特発性／自己免疫性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、ＩｇＡ性神経障害、若年性関節炎、扁平苔癬、エリテマトーデス、メニエール病、混合型結合組織病、多発性硬化症、１型糖尿病または免疫媒介性糖尿病、重症筋無力症、天疱瘡関連障害（例えば、尋常性天疱瘡）、骨髄異形成症候群、悪性貧血、結節性動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性自己免疫性症候群、リウマチ性多発性筋痛、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティッフマン症候群、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、スイート症候群、スティル病、エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭部動脈炎／巨細胞動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、血管炎、尋常性白斑、およびウェゲナー肉芽腫症である。炎症性障害の例には、喘息、脳炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、アレルギー性障害、敗血症性ショック、肺線維症、未分化型脊椎関節症、未分化型関節症、関節炎、炎症性骨溶解、移植片対宿主病、蕁麻疹、またはフォークト－小柳－原田症候群が含まれるがこれらに限定されない。別の実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。

【００２７】

別の態様では、本発明が、哺乳動物における自己免疫疾患を治療する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤ならびに薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、配列番号４のタンパク質に特異的に結合する、抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含む方法を提供する。一実施形態では、自己免疫疾患が、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、喘息、自己免疫性副腎疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎および自己免疫性抗癌炎、自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスプルー－皮膚炎、慢性疲労性免疫不全症候群（ＣＦＩＤＳ）、慢性炎症性脱髄性多発性神経障害、チャーグ－ストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡、ＣＲＥＳＴ症

候群、寒冷凝集素症、クローン病、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、疱疹状皮膚炎、糖尿病（例えば、１型）、好酸球性筋膜炎、線維筋痛症－線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン－バレー症候群、橋本甲状腺炎、ヘノッホ－シェーンライン紫斑病、特発性肺線維症、特発性／自己免疫性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、ＩｇＡ性神経障害、若年性関節炎、扁平苔癬、エリテマトーデス、メニエール病、混合型結合組織病、多発性硬化症、１型糖尿病または免疫媒介性糖尿病、重症筋無力症、天疱瘡関連障害（例えば、尋常性天疱瘡）、骨髄異形成症候群、悪性貧血、結節性動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性自己免疫性症候群、リウマチ性多発性筋痛、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティッフマン症候群、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、スイート症候群、スティル病、エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭部動脈炎／巨細胞動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、血管炎、尋常性白斑、およびウェゲナー肉芽腫症である。炎症性障害の例には、喘息、脳炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、アレルギー性障害、敗血症性ショック、肺線維症、未分化型脊椎関節症、未分化型関節症、関節炎、炎症性骨溶解、移植片対宿主病、蕁麻疹、またはフォークト－小柳－原田症候群が含まれるがこれらに限定されない。別の実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。

【００２８】

別の態様では、本発明が、哺乳動物における気道疾患を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間（４８、７２、または９６時間）にわたりインキュベートすると、前記抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１０～１００％（１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、９０、１００％）を死滅させる方法を提供する。別の実施形態では、気道疾患が、喘息、慢性閉塞性肺疾患、特発性肺線維症、または炎症性肺炎である。別の実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、前記抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。

【００２９】

別の態様では、本発明が、哺乳動物における気道疾患を治療する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、配列番号２のタンパク質に特異的に結合するヒト抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含む方法を提供する。別の実施形態では、気道疾患が、喘息、慢性閉塞性肺疾患、特発性肺線維症、または炎症性肺炎である。別の実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。

【００３０】

別の態様では、本発明が、哺乳動物における気道疾患を治療する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、配列番号４のタンパク質に特異的に結合する、抗

ヌクレオリン抗体またはその断片を含む方法を提供する。別の実施形態では、気道疾患が、喘息、慢性閉塞性肺疾患、特発性肺線維症、または炎症性肺炎である。別の実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。

【００３１】

別の態様では、本発明が、哺乳動物におけるウイルスに感染した細胞を治療する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、前記抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる方法を提供する。別の実施形態では、ウイルスに感染した細胞が、ＨＩＶウイルスに感染している。別の実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、抗ヌクレオリンモノクローナル抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。

【００３２】

別の態様では、本発明が、哺乳動物におけるウイルスに感染した細胞を治療する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、配列番号２のタンパク質に特異的に結合するヒト抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含む方法を提供する。別の実施形態では、ウイルスに感染した細胞が、ＨＩＶウイルスに感染している。別の実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、抗ヌクレオリンモノクローナル抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。

【００３３】

別の態様では、本発明が、哺乳動物におけるウイルスに感染した細胞を治療する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、配列番号４のタンパク質に特異的に結合する、抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含む方法を提供する。別の実施形態では、ウイルスに感染した細胞が、ＨＩＶウイルスに感染している。別の実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、抗ヌクレオリンモノクローナル抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。

【００３４】

別の態様では、本発明が、ヌクレオリンの表面発現の増大を特徴とする、哺乳動物における非癌性状態または非癌性疾患を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間（４８、７２、または９６時間など）にわたりインキュベートすると、前記抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１０～１００％（１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、または１００％など）を死滅させる方法を提供する。一実施形態では、ヌクレオリンの表面発現の増大を特徴とする、哺乳動物における該状態または疾患が、黄斑変性、糖尿病性網膜症、または炎症性疾患である。別の実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態

では、抗ヌクレオリンモノクローナル抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。

【００３５】

別の態様では、本発明が、ヌクレオリンの表面発現の増大を特徴とする、哺乳動物における非癌性状態または非癌性疾患を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、配列番号２のタンパク質に特異的に結合する、ヒト抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含む方法を提供する。一実施形態では、ヌクレオリンの表面発現の増大を特徴とする、哺乳動物における該状態または疾患が、黄斑変性、糖尿病性網膜症、または炎症性疾患である。別の実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、抗ヌクレオリンモノクローナル抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。

【００３６】

別の態様では、本発明が、ヌクレオリンの表面発現の増大を特徴とする、哺乳動物における非癌性状態または非癌性疾患を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、配列番号４のタンパク質に特異的に結合する、抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含む方法を提供する。一実施形態では、ヌクレオリンの表面発現の増大を特徴とする、哺乳動物における該状態または疾患が、黄斑変性、糖尿病性網膜症、または炎症性疾患である。別の実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、抗ヌクレオリンモノクローナル抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。

【００３７】

別の態様では、本発明が、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも５０％を死滅させる、抗ヌクレオリン剤を提供する。別の実施形態では、前記抗ヌクレオリン剤がヒトに対して実質的に非免疫原性である。

【００３８】

別の態様では、本発明が、ＭＣＦ－７細胞およびＭＣＦ１０Ａ細胞の個別の集団ならびに熱不活化血清と共に７２または９６時間にわたりインキュベートすると、ＭＣＦ１０Ａ細胞より多くのＭＣＦ－７細胞を死滅させる、抗ヌクレオリン剤を提供する。別の実施形態では、前記抗ヌクレオリン剤がヒトに対して実質的に非免疫原性である。

【００３９】

別の態様では、本発明が、ＭＣＦ－７細胞およびＭＣＦ１０Ａ細胞の個別の集団ならびにヒトＡＢ血清と共に９６時間にわたりインキュベートすると、ＭＣＦ１０Ａ細胞より多くのＭＣＦ－７細胞を死滅させる、抗ヌクレオリン剤を提供する。別の実施形態では、前記抗ヌクレオリン剤がヒトに対して実質的に非免疫原性である。

【００４０】

別の態様では、本発明が、配列番号４のタンパク質に特異的に結合し、それらの細胞表面においてヌクレオリンを発現する１または複数の癌細胞を阻害するかまたは死滅させる、抗ヌクレオリン剤を提供する。別の実施形態では、前記抗ヌクレオリン剤が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。

【００４１】

別の態様では、本発明が、１または複数の前癌性細胞における細胞表面ヌクレオリン発

現の増大を検出することにより、被験体が癌を発生させる可能性を決定する方法を提供する。

【００４２】

別の態様では、本発明が、Ｆａｂ断片、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、もしくはＦｖ断片；ダイアボディー；直鎖状抗体；単鎖抗体；または抗体断片から形成される多重特異性抗体である、前記請求項のいずれかに記載の抗体を提供する。

【００４３】

別の態様では、本発明が、Ｆａｂ断片、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、もしくはＦｖ断片；ダイアボディー；直鎖状抗体；単鎖抗体；または抗体断片から形成される多重特異性抗体である抗体断片の使用を含む、前記請求項のいずれかに記載の方法を提供する。

【００４４】

以下の図面は、本明細書の部分を形成し、本発明のある態様をさらに裏付ける目的で包含される。本明細書で示される具体的な実施形態についての詳細な説明と組み合わせて、これらの図面のうちの１または複数を参照することにより、本発明をより十分に理解することができる。

【図面の簡単な説明】

【００４５】

【図１】図１は、正常Ｂ細胞と対比したＣＬＬ細胞における、ヌクレオリンタンパク質およびＢｃｌ－２タンパク質の過剰発現を示す図である。密度勾配遠心分離により、ＣＬＬ患者および健常ボランティアから、末梢血リンパ球を単離し、磁気活性化細胞分離（ＭＡＣＳ）によるＣＤ１９免疫磁性ビーズを伴う陽性選択を介して、Ｂ細胞を精製した。ヌクレオリンタンパク質レベルおよびＢｃｌ－２タンパク質レベルは、ウェスタンブロッティングにより、細胞のＳ１０抽出物において測定した。結果は、公知量のヌクレオリンタンパク質外部標準物質およびＢｃｌ－２タンパク質外部標準物質から得られる値に照らして正規化した。Ｘ軸に沿う、ＮおよびＣの表示は、それぞれ、個別の被験体に由来する正常Ｂ細胞およびＣＬＬ細胞を指す。Ｎ＝健常ボランティアに由来するＣＤ１９＋　Ｂ細胞；Ｃ＝ＣＤ１９＋　ＣＬＬ細胞。

【図２Ａ】図２Ａ～Ｂは、正常Ｂ細胞と対比したＣＬＬ細胞における、ヌクレオリンの細胞内局在化、ならびにＭＣＦ－１０Ａ細胞と対比したＭＣＦ－７細胞における、ヌクレオリンの細胞内局在化を示す図である。マウス抗ヒトヌクレオリンｍＡｂと、ＦＩＴＣコンジュゲート抗マウス二次ＩｇＧとを用いる間接的な免疫蛍光により、ヌクレオリンの細胞内局在化を決定した。ヨウ化プロピジウムにより、核を対比染色した。図２Ａは、ＣＬＬ細胞と正常Ｂ細胞との比較を示す図である。図２Ｂは、ＭＣＦ－７細胞とＭＣＦ－１０Ａ細胞との比較を示す図である。

【図２Ｂ】図２Ａ～Ｂは、正常Ｂ細胞と対比したＣＬＬ細胞における、ヌクレオリンの細胞内局在化、ならびにＭＣＦ－１０Ａ細胞と対比したＭＣＦ－７細胞における、ヌクレオリンの細胞内局在化を示す図である。マウス抗ヒトヌクレオリンｍＡｂと、ＦＩＴＣコンジュゲート抗マウス二次ＩｇＧとを用いる間接的な免疫蛍光により、ヌクレオリンの細胞内局在化を決定した。ヨウ化プロピジウムにより、核を対比染色した。図２Ａは、ＣＬＬ細胞と正常Ｂ細胞との比較を示す図である。図２Ｂは、ＭＣＦ－７細胞とＭＣＦ－１０Ａ細胞との比較を示す図である。

【図３】図３は、ＭＣＦ－７細胞およびＭＣＦ－１０Ａ細胞におけるヌクレオリンの細胞内局在化を示す図である。ヒトヌクレオリンに対するモノクローナル抗体と、ＦＩＴＣコンジュゲート抗マウス二次ＩｇＧとを用いる間接的な免疫蛍光により、ヌクレオリンの細胞内局在化を決定した。ヨウ化プロピジウムにより、核を対比染色した。微分干渉コントラスト（ＤＩＣ）画像として細胞形態を示す。結果は、３つの個別の実験を表わす。

【図４】図４は、抗ヌクレオリン抗体で染色（フクシンによる染色）した、ＡＭＬ－Ｍ１患者に由来する骨髄生検による強度の核染色を示す図である。散在性の非白血病性骨髄要素は、陰性（暗青色の対比染色）であるか、または核の赤変だけを示す。拡大率は、４０

倍とした。
【図５Ａ】図５は、ヒトＡＭＬ移植マウスに由来する脾臓切片におけるヌクレオリンの過剰発現、およびヒト乳癌細胞によるヌクレオリンの過剰発現を示す図である。（図５Ａ）図５Ａは、マウス脾臓内に、十分に明瞭な２つの結節状ヒト白血病性浸潤物が存在することを示す図である。該白血病性浸潤物は、ヌクレオリンについて陽性である（フクシンによる免疫染色）。これを取り巻くマウス脾臓内のリンパ球は、ヌクレオリンの免疫染色について陰性（青色の対比染色）である。拡大率は、４０倍とした。（図５Ｂ）図５Ｂは、ホルマリンで固定してパラフィン中に包埋した５０例のヒト乳癌組織ならびに隣接する正常組織による組織アレイ（Ｂｉｏｍａｘ　ＢＲ１００６）を、Ｖｅｃｔａｓｔａｉｎマウスキット、ＤＡＢ基質、およびヘマトキシリン対比染色を用いて、抗ヌクレオリンｍＡｂであるＭＳ３（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　１：１００）により染色したことを示す図である。１００倍の拡大率によるＯｌｙｍｐｕｓ　ＣＫＸ４１上で、代表的な症例を造影した。
【図５Ｂ】図５は、ヒトＡＭＬ移植マウスに由来する脾臓切片におけるヌクレオリンの過剰発現、およびヒト乳癌細胞によるヌクレオリンの過剰発現を示す図である。（図５Ａ）図５Ａは、マウス脾臓内に、十分に明瞭な２つの結節状ヒト白血病性浸潤物が存在することを示す図である。該白血病性浸潤物は、ヌクレオリンについて陽性である（フクシンによる免疫染色）。これを取り巻くマウス脾臓内のリンパ球は、ヌクレオリンの免疫染色について陰性（青色の対比染色）である。拡大率は、４０倍とした。（図５Ｂ）図５Ｂは、ホルマリンで固定してパラフィン中に包埋した５０例のヒト乳癌組織ならびに隣接する正常組織による組織アレイ（Ｂｉｏｍａｘ　ＢＲ１００６）を、Ｖｅｃｔａｓｔａｉｎマウスキット、ＤＡＢ基質、およびヘマトキシリン対比染色を用いて、抗ヌクレオリンｍＡｂであるＭＳ３（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　１：１００）により染色したことを示す図である。１００倍の拡大率によるＯｌｙｍｐｕｓ　ＣＫＸ４１上で、代表的な症例を造影した。
【図６】図６は、ＣＬＬ細胞および正常Ｂ細胞における、ｂｃｌ－２　ｈｎＲＮＡおよびｂｃｌ－２　ｍＲＮＡの相対発現レベルを示す図である。４例のＣＬＬ患者に由来するＣＬＬ細胞、ならびに４例の健常ボランティアに由来する正常Ｂ細胞における、ｂｃｌ２　ｈｎＲＮＡレベルおよびｂｃｌ２　ｍＲＮＡレベルは、ＲＴ－ＰＣＲにより決定した。結果は、１群当たり４回ずつの決定の平均±ＳＥＭとして示す。＊正常Ｂ細胞との比較でＰ＜０．００１。
【図７】図７は、ＣＬＬ細胞抽出物および正常Ｂ細胞抽出物における、ｂｃｌ－２　ｍＲＮＡの減殺を示す図である。５’－キャップ［$^{32}$Ｐ］ｂｃｌ－２－ＣＲ　ＲＮＡおよびポリアデニル化［$^{32}$Ｐ］ｂｃｌ－２－ＣＲ　ＲＮＡ、ならびに５’－キャップ［$^{32}$Ｐ］ｂｃｌ－２－ＣＲ－ＡＲＥ　ＲＮＡおよびポリアデニル化［$^{32}$Ｐ］ｂｃｌ－２－ＣＲ－ＡＲＥ　ＲＮＡを、４例の患者に由来するＣＬＬ細胞、または３例のヒトボランティアに由来する正常Ｂ細胞から調製されたＳ１００抽出物と共にインキュベートした。表示される時点において、反応混合物のアリコートを採取し、ＰＡＧＥおよびリン光による造影を介して解析した。時間の関数としての、残存する全長ＲＮＡの平均百分率±ＳＥＭとして、結果を表わす。記号：－○－　ＣＬＬ細胞抽出物＋［$^{32}$Ｐ］ｂｃｌ－２－ＣＲ　ＲＮＡ；－●－　ＣＬＬ細胞抽出物＋［$^{32}$Ｐ］ｂｃｌ－２－ＣＲ－ＡＲＥ　ＲＮＡ；－□－　正常Ｂ細胞抽出物＋［$^{32}$Ｐ］ｂｃｌ－２－ＣＲ　ＲＮＡ；－－　正常Ｂ細胞抽出物＋［$^{32}$Ｐ］ｂｃｌ－２－ＣＲ－ＡＲＥ　ＲＮＡ；－▲－　正常細胞抽出物＋［$^{32}$Ｐ］ｂｃｌ－２－ＣＲ－ＡＲＥ　ＲＮＡ＋２８０ｎＭの精製組換えヌクレオリン。
【図８】図８は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるヒトｍＡｂの生成を示す図である。扁桃腺Ｂ細胞を単離し、ＥＢＶにより効率的に不死化し、次いで、抗体生成細胞へと分化するように誘導する。不死化Ｂ細胞ライブラリーを複数のウェル内に入れ、次いで、ＩｇＧを含有する細胞上清を、組換えヌクレオリンに対する結合についてスクリーニングする。限界希釈により反応細胞をクローニングし、増殖させ、培養物上清からＩｇＧを精製する。生成細胞系内にＩｇ遺伝子をサブクローニングして、組換えＩｇＧを大スケールで生成する。ＰＣＴ／ＵＳ２００８／０７２１２４を参照されたい。
【図９】図９Ａ～Ｂは、扁桃腺Ｂ細胞ライブラリーにおける、効率的なＥＢＶ感染、およ

び分化の誘導を示す図である。（図９Ａ）図９Ａは、従来の上清による感染後（上パネル）、または濃縮ウイルスによるスピンフェクション後（下パネル）において対照と比較した、ＧＦＰ標識ＥＢＶ（ＥＢｆａＶ－ＧＦＰ）による感染の２４時間後における扁桃腺Ｂ細胞についてのフローサイトメトリー解析を示す図である。ＧＦＰによる蛍光発光は、感染を示している。（図９Ｂ）図９Ｂは、抗ＩｇＭ　Ｆ（ａｂ’）２、組換え可溶性ＣＤ４０Ｌ、およびＢａｆｆを伴い、または伴わずに、４つのＢ９５－８　ＥＢＶ不死化扁桃腺Ｂ細胞ライブラリーを培養したことを示す図である。５日目（上パネル）または１５日目（下パネル）において、ＥＬＩＳＡにより、ＩｇＭおよびＩｇＧについて、細胞上清をアッセイした。

【図１０】図１０Ａ～Ｂは、ヌクレオリン特異的なヒト抗体を生成する、８つの不死化Ｂ細胞系の単離を示す図である。（図１０Ａ）図１０Ａは、ＨＲＰ標識ヤギ抗ヒトＩｇＧおよび比色基質を検出に用いるＥＬＩＳＡにより、抗ヌクレオリン抗体を生成する６つのヒトＢ細胞系から得た培養物上清を、組換えΔ１～２８３Ｎｕｃ－（Ｈｉｓ）$_6$ヌクレオリン（Ｎ末端のアミノ酸１～２８３を欠くヌクレオリン）への結合についてスクリーニングした。４５０ｎｍにおける分光光度法により、結合を測定した。結果を、ヒト抗ＨＡ　ＩｇＧまたはマウス抗ヌクレオリン抗体であるＭＳ３を含有する培養物上清から得られる結果と比較した。（図１０Ｂ）図１０Ｂは、抗ヌクレオリン抗体を生成する８つのＢ細胞系を、限界希釈クローニングによりサブクローニングした。３週間後、各９６ウェルプレート上のウェルのうちで、小規模なモノクローナル抗体のコロニーを含有するウェルは１０％未満であり、次いで、これらを、ＥＬＩＳＡにより、上記で説明した組換えヌクレオリンへの結合について調べた。４５０ｎｍにおける吸光度を測定することにより、ウェル内のヌクレオリン結合を評価した。

【図１１】図１１は、ヒト抗ヌクレオリン抗体の単離を示す図である。不死化ヒトＢ細胞ライブラリーに由来する上清を、ＥＬＩＳＡ（上図）およびウェスタンブロッティング（下図）により、組換えΔ１～２８３Ｎｕｃ－（Ｈｉｓ）$_6$ヌクレオリン、および／またはＭＶ４１１白血病細胞から単離された内因性ヌクレオリンへの結合についてスクリーニングした。

【図１２】図１２は、細胞表面ヌクレオリンに対するＨｕＭＡｂの結合、およびＭＶ４－１１白血病細胞に対する細胞傷害作用を示す図である。抗ヌクレオリンＨｕＭＡｂまたはＲｉｔｕｘａｎ（登録商標）（５μｇ／ｍｌ）を、氷上で３０分間にわたり、ＭＶ４－１１細胞または正常扁桃腺細胞と共にインキュベートし、洗浄し、次いで、ＡＰＣ標識抗ヒトＩｇＧ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）と共にインキュベートした。ＦＡＣＳＣａｌｉｂｅｒ上においてフローサイトメトリーを実施し、中央値による蛍光強度（ＭＦＩ）を示す。

【図１３】図１３は、ＭＶ４－１１細胞に対する補体媒介性殺滅を示す図である。抗体生成Ｂ細胞系に由来する上清を、ヒト血清（２５％ｖ／ｖ）の存在下において、１６時間にわたり、ＭＶ４１１細胞（５０％ｖ／ｖ）と共にインキュベートした。スタウロルポリン（２５μＭ）による処理、または媒体による処理（非処理）を対照とした。次いで、ヨウ化プロピジウムおよびアネキシンＶ－ＦＩＴＣにより細胞を染色し、フローサイトメトリーにより解析した。

【図１４Ａ】図１４Ａ～Ｃは、ＭＣＦ－７　ＡＭＬ細胞およびＭＶ４－１１　ＡＭＬ細胞に対するヌクレオリン特異的殺滅が、補体依存性機構および補体非依存性機構を介して生じることを示す図である。（図１４Ａ）図１４Ａは、ヒトＡＢ血清（＋補体）またはヒト熱不活化血清（－補体）の存在下において、ＭＣＦ－７細胞を、抗ヌクレオリンＨｕＭＡｂ（２μｇ／ｍｌ）と共にインキュベートしたことを示す図である。４８～９６時間後におけるＭＴＳアッセイにより、生存率を決定した。（図１４Ｂ）図１４Ｂは、ヒトＡＢ血清（＋補体）またはヒト熱不活化血清（－補体）の存在下において、ＭＣＦ－７細胞およびＭＣＦ１０Ａ細胞を、抗ヌクレオリンＨｕＭＡｂ（２μｇ／ｍｌ：上パネル；または１ｍｇ／ｍｌ：下パネル）またはＡＳ１４１１（２０μＭ）と共にインキュベートしたことを示す図である。７２時間後（上パネル）および９６時間後（下パネル）におけるＭＴＳアッセイにより、生存率を決定した。（図１４Ｃ）図１４Ｃは、ヒトＡＢ血清（＋補体）

またはヒト熱不活化血清（－補体）の存在下において、ＭＶ４－１１細胞を、抗ヌクレオリンＨｕＭＡｂ（２μｇ／ｍｌ）またはＡＳ１４１１（２０μＭ）と共にインキュベートしたことを示す図である。４８～９６時間後におけるＭＴＳアッセイにより、生存率を決定した。

【図１４Ｂ】図１４Ａ～Ｃは、ＭＣＦ－７　ＡＭＬ細胞およびＭＶ４－１１　ＡＭＬ細胞に対するヌクレオリン特異的殺滅が、補体依存性機構および補体非依存性機構を介して生じることを示す図である。（図１４Ａ）図１４Ａは、ヒトＡＢ血清（＋補体）またはヒト熱不活化血清（－補体）の存在下において、ＭＣＦ－７細胞を、抗ヌクレオリンＨｕＭＡｂ（２μｇ／ｍｌ）と共にインキュベートしたことを示す図である。４８～９６時間後におけるＭＴＳアッセイにより、生存率を決定した。（図１４Ｂ）図１４Ｂは、ヒトＡＢ血清（＋補体）またはヒト熱不活化血清（－補体）の存在下において、ＭＣＦ－７細胞およびＭＣＦ１０Ａ細胞を、抗ヌクレオリンＨｕＭＡｂ（２μｇ／ｍｌ：上パネル；または１ｍｇ／ｍｌ：下パネル）またはＡＳ１４１１（２０μＭ）と共にインキュベートしたことを示す図である。７２時間後（上パネル）および９６時間後（下パネル）におけるＭＴＳアッセイにより、生存率を決定した。（図１４Ｃ）図１４Ｃは、ヒトＡＢ血清（＋補体）またはヒト熱不活化血清（－補体）の存在下において、ＭＶ４－１１細胞を、抗ヌクレオリンＨｕＭＡｂ（２μｇ／ｍｌ）またはＡＳ１４１１（２０μＭ）と共にインキュベートしたことを示す図である。４８～９６時間後におけるＭＴＳアッセイにより、生存率を決定した。

【図１４Ｃ】図１４Ａ～Ｃは、ＭＣＦ－７　ＡＭＬ細胞およびＭＶ４－１１　ＡＭＬ細胞に対するヌクレオリン特異的殺滅が、補体依存性機構および補体非依存性機構を介して生じることを示す図である。（図１４Ａ）図１４Ａは、ヒトＡＢ血清（＋補体）またはヒト熱不活化血清（－補体）の存在下において、ＭＣＦ－７細胞を、抗ヌクレオリンＨｕＭＡｂ（２μｇ／ｍｌ）と共にインキュベートしたことを示す図である。４８～９６時間後におけるＭＴＳアッセイにより、生存率を決定した。（図１４Ｂ）図１４Ｂは、ヒトＡＢ血清（＋補体）またはヒト熱不活化血清（－補体）の存在下において、ＭＣＦ－７細胞およびＭＣＦ１０Ａ細胞を、抗ヌクレオリンＨｕＭＡｂ（２μｇ／ｍｌ：上パネル；または１ｍｇ／ｍｌ：下パネル）またはＡＳ１４１１（２０μＭ）と共にインキュベートしたことを示す図である。７２時間後（上パネル）および９６時間後（下パネル）におけるＭＴＳアッセイにより、生存率を決定した。（図１４Ｃ）図１４Ｃは、ヒトＡＢ血清（＋補体）またはヒト熱不活化血清（－補体）の存在下において、ＭＶ４－１１細胞を、抗ヌクレオリンＨｕＭＡｂ（２μｇ／ｍｌ）またはＡＳ１４１１（２０μＭ）と共にインキュベートしたことを示す図である。４８～９６時間後におけるＭＴＳアッセイにより、生存率を決定した。

【発明を実施するための形態】

【００４６】

本発明は、ヒトヌクレオリンに特異的に結合するヒトモノクローナル抗体、およびそれらを用いる方法を提供する。これらの抗体は、癌、自己免疫障害、ウイルス性障害に関与する細胞など、細胞膜においてヒトヌクレオリンを発現する細胞に対して細胞傷害作用を呈示する。したがって、該抗体は、癌および自己免疫障害のうちのある形態に対する治療的可能性を有し、また、診断剤としてもこれを用いることができる。

【００４７】

Ｉ．ヌクレオリン

Ａ．総説

ヌクレオリンとは、ＤＮＡ、ＲＮＡ、および細胞膜の外部表面に結合する多機能性タンパク質である。ヌクレオリンが細胞内で多数かつ多様な機能を果たす能力は、このタンパク質中の複数の構造ドメインと関連する。その負に帯電したＮ末端ドメインが、核染色体の凝縮解除を誘導することにより、ｒＤＮＡの転写を制御する（Ｓｒｉｖａｓｔａｖａら、１９８９年）のに対し、中央部の球状ドメインは、４つのＲＮＡ結合ドメイン（ＲＢＤ）を含有する（Ｓｅｒｉｎら、１９９７年）。ヌクレオリンは、そのＲＢＤおよびそのＲ

ＧＧに富むＣ末端ドメインの、プレリボソームＲＮＡへの結合を介して、適正にフォールドしたｒＲＮＡと、ｒＲＮＡの成熟およびリボソームの構築に必要な他の構成要素とをまとめることにより、構築因子として機能することが提案された（Ｇｉｎｉｓｔｙら、２００１年）。ヌクレオリンはまた、細胞質と核との間をシャトリングしながら、リボソームを細胞質へと移出させることにも関与している可能性がある（ＳｒｉｖａｓｔａｖａおよびＰｏｌｌａｒｄ、１９９９年）。ヌクレオリン遺伝子のコード配列およびヌクレオリンのタンパク質配列を、表１に列挙する。

【００４８】

【表１－１】

表 1: ヌクレオリン配列

| 配列番号 | ID | 配列 |
|---|---|---|
| 1 | ヒトヌクレオリンコード配列<br><br>受託番号<br>NM_005381<br>XM_002342275 | CTTTCGCCTCAGTCTCGAGCTCTCGCTGGCCTTCGGG<br>TGTACGTGCTCCGGGATCTTCAGCACCCGCGGCCGCC<br>ATCGCCGTCGCTTGGCTTCTTCTGGACTCATCTGCGC<br>CACTTGTCCGCTTCACACTCCGCCGCCATCATGGTGA<br>AGCTCGCGAAGGCAGGTAAAAATCAAGGTGACCCCA<br>AGAAAATGGCTCCTCCTCCAAAGGAGGTAGAAGAAG<br>ATAGTGAAGATGAGGAAATGTCAGAAGATGAAGAAG<br>ATGATAGCAGTGGAGAAGAGGTCGTCATACCTCAGA<br>AGAAAGGCAAGAAGGCTGCTGCAACCTCAGCAAAGA<br>AGGTGGTCGTTTCCCCAACAAAAAAGGTTGCAGTTGC<br>CACACCAGCCAAGAAAGCAGCTGTCACTCCAGGCAA<br>AAAGGCAGCAGCAACACCTGCCAAGAAGACAGTTAC<br>ACCAGCCAAAGCAGTTACCACACCTGGCAAGAAGGG<br>AGCCACACCAGGCAAAGCATTGGTAGCAACTCCTGG<br>TAAGAAGGGTGCTGCCATCCCAGCCAAGGGGGCAAA<br>GAATGGCAAGAATGCCAAGAAGGAAGACAGTGATG<br>AAGAGGAGGATGATGACAGTGAGGAGGATGAGGAG<br>GATGACGAGGACGAGGATGAGGATGAAGATGAAATT<br>GAACCAGCAGCGATGAAAGCAGCAGCTGCTGCCCCT<br>GCCTCAGAGGATGAGGACGATGAGGATGACGAAGAT<br>GATGAGGATGACGATGACGATGAGGAAGATGACTCT<br>GAAGAAGAAGCTATGGAGACTACACCAGCCAAAGGA<br>AAGAAAGCTGCAAAAGTTGTTCCTGTGAAAGCCAAG<br>AACGTGGCTGAGGATGAAGATGAAGAAGAGGATGAT<br>GAGGACGAGGATGACGACGACGACGAAGATGATGA<br>AGATGATGATGATGAAGATGATGAGGAGGAGGAAG<br>AAGAGGAGGAGGAAGAGCCTGTCAAAGAAGCACCT<br>GGAAAACGAAAGAAGGAAATGGCCAAACAGAAAGC<br>AGCTCCTGAAGCCAAGAAACAGAAAGTGGAAGGCAC<br>AGAACCGACTACGGCTTTCAATCTCTTTGTTGGAAAC<br>CTAAACTTTAACAAATCTGCTCCTGAATTAAAAACTG<br>GTATCAGCGATGTTTTTGCTAAAAATGATCTTGCTGT<br>TGTGGATGTCAGAATTGGTATGACTAGGAAATTTGGT<br>TATGTGGATTTTGAATCTGCTGAAGACCTGGAGAAAG<br>CGTTGGAACTCACTGGTTTGAAAGTCTTTGGCAATGA<br>AATTAAACTAGAGAAACCAAAAGGAAAAGACAGTA<br>AGAAAGAGCGAGATGCGAGAACACTTTTGGCTAAAA<br>ATCTCCCTTACAAAGTCACTCAGGATGAATTGAAAGA<br>AGTGTTTGAAGATGCTGCGGAGATCAGATTAGTCAG<br>CAAGGATGGGAAAAGTAAAGGGATTGCTTATATTGA<br>ATTTAAGACAGAAGCTGATGCAGAGAAAACCTTTGA<br>AGAAAAGCAGGGAACAGAGATCGATGGGCGATCTAT<br>TTCCCTGTACTATACTGGAGAGAAAGGTCAAAATCA<br>AGACTATAGAGGTGGAAAGAATAGCACTTGGAGTGG<br>TGAATCAAAAACTCTGGTTTTAAGCAACCTCTCCTAC<br>AGTGCAACAGAAGAAACTCTTCAGGAAGTATTTGAG<br>AAAGCAACTTTTATCAAAGTACCCCAGAACCAAAAT<br>GGCAAATCTAAAGGGTATGCATTTATAGAGTTTGCTT<br>CATTCGAAGACGCTAAAGAAGCTTTAAATTCCTGTAA<br>TAAAAGGGAAATTGAGGGCAGAGCAATCAGGCTGGA<br>GTTGCAAGGACCCAGGGGATCACCTAATGCCAGAAG<br>CCAGCCATCCAAAACTCTGTTTGTCAAAGGCCTGTCT<br>GAGGATACCACTGAAGAGACATTAAAGGAGTCATTT |

【００４９】

【表１－２】

| | | |
|---|---|---|
| | | GACGGCTCCGTTCGGGCAAGGATAGTTACTGACCGG<br>GAAACTGGGTCCTCCAAAGGGTTTGGTTTTGTAGACT<br>TCAACAGTGAGGAGGATGCCAAAGCTGCCAAGGAGG<br>CCATGGAAGACGGTGAAATTGATGGAAATAAAGTTA<br>CCTTGGACTGGGCCAAACCTAAGGGTGAAGGTGGCT<br>TCGGGGGTCGTGGTGGAGGCAGAGGCGGCTTTGGAG<br>GACGAGGTGGTGGTAGAGGAGGCCGAGGAGGATTTG<br>GTGGCAGAGGCCGGGGAGGCTTTGGAGGGCGAGGAG<br>GCTTCCGAGGAGGCAGAGGAGGAGGAGGTGACCACA<br>AGCCACAAGGAAAGAAGACGAAGTTTGAATAGCTTC<br>TGTCCCTCTGCTTTCCCTTTTCCATTTGAAAGAAAGG<br>ACTCTGGGGTTTTTACTGTTACCTGATCAATGACAGA<br>GCCTTCTGAGGACATTCCAAGACAGTATACAGTCCTG<br>TGGTCTCCTTGGAAATCCGTCTAGTTAACATTTCAAG<br>GGCAATACCGTGTTGGTTTTGACTGGATATTCATATA<br>AACTTTTTAAAGAGTTGAGTGATAGAGCTAACCCTTA<br>TCTGTAAGTTTTGAATTTATATTGTTTCATCCCATGTA<br>CAAAACCATTTTTTCCTACAAATAGTTTGGGTTTTGTT<br>GTTGTTTCTTTTTTTTGTTTTGTTTTTGTTTTTTTTTTT<br>TTGCGTTCGTGGGGTTGTAAAAGAAAAGAAAGCAGA<br>ATGTTTTATCATGGTTTTTGCTTCAGCGGCTTTAGGAC<br>AAATTAAAAGTCAACTCTGGTGCCAGAAAAAAAAAA<br>AAAAAA |
| 2 | ヒトヌクレオリン全長アミノ酸配列<br><br>受託番号<br>NP_005372<br>XP_002342316 | MVKLAKAGKNQGDPKKMAPPPKEVEEDSEDEEMSEDE<br>EDDSSGEEVVIPQKKGKKAAATSAKKVVVSPTKKVAV<br>ATPAKKAAVTPGKKAAATPAKKTVTPAKAVTTPGKKG<br>ATPGKALVATPGKKGAAIPAKGAKNGKNAKKEDSDEE<br>EDDDSEEDEEDDEDEDEDEDEIEPAAMKAAAAAPASED<br>EDDEDDEDDEDDDDDEEDDSEEEAMETTPAKGKKAAK<br>VVPVKAKNVAEDEDEEEDDEDEDDDDDEDDEDDDDE<br>DDEEEEEEEEEEPVKEAPGKRKKEMAKQKAAPEAKKQ<br>KVEGTEPTTAFNLFVGNLNFNKSAPELKTGISDVFAKN<br>DLAVVDVRIGMTRKFGYVDFESAEDLEKALELTGLKVF<br>GNEIKLEKPKGKDSKKERDARTLLAKNLPYKVTQDELK<br>EVFEDAAEIRLVSKDGKSKGIAYIEFKTEADAEKTFEEK<br>QGTEIDGRSISLYYTGEKGQNQDYRGGKNSTWSGESKT<br>LVLSNLSYSATEETLQEVFEKATFIKVPQNQNGKSKGY<br>AFIEFASFEDAKEALNSCNKREIEGRAIRLELQGPRGSPN<br>ARSQPSKTLFVKGLSEDTTEETLKESFDGSVRARIVTDR<br>ETGSSKGFGFVDFNSEEDAKAAKEAMEDGEIDGNKVTL<br>DWAKPKGEGGFGGRGGGRGGFGGRGGGRGGRGGFGG<br>RGRGGFGGRGGFRGGRGGGGDHKPQGKKTKFE |
| 3 | ヒトヌクレオリン欠失構築物のアミノ酸配列であるΔ1～283Nuc(残基1～283を欠く)のコード配列 | aagaaggaaatggccaaacagaaagcagctcctgaagccaa<br>gaaacagaaagtggaaggcacagaaccgactacggctttc<br>aatctctttgttggaaacctaaactttaacaaatctgctc<br>ctgaattaaaaactggtatcagcgatgtttttgctaaaaa<br>tgatcttgctgttgtggatgtcagaattggtatgactagg<br>aaatttggttatgtggattttgaatctgctgaagacctgg<br>agaaagcgttggaactcactggtttgaaagtctttggcaa<br>tgaaattaaactagagaaaccaaaaggaaaagacagtaag<br>aaagagcgagatgcgagaacacttttggctaaaaatctcc<br>cttacaaagtcactcaggatgaattgaaagaagtgtttga<br>agatgctgcggagatcagattagtcagcaaggatgggaaa<br>agtaaagggattgcttatattgaatttaagacagaagctg<br>atgcagagaaaaccctttgaagaaaagcagggaacagagat<br>cgatgggcgatctatttccctgtactatactggagagaaa<br>ggtcaaaatcaagactatagaggtggaaagaatagcactt<br>ggagtggtgaatcaaaaactctggttttaagcaacctctc<br>ctacagtgcaacagaagaaactcttcaggaagtatttgag |

【００５０】

【表１－３】

| | | |
|---|---|---|
| | | aaagcaacttttatcaaagtaccccagaaccaaaatggca<br>aatctaaagggtatgcatttatagagtttgcttcattcga<br>agacgctaaagaagctttaaattcctgtaataaaagggaa<br>attgagggcagagcaatcaggctggagttgcaaggaccca<br>ggggatcacctaatgccagaagccagccatccaaaactct<br>gtttgtcaaaggcctgtctgaggataccactgaagagaca<br>ttaaaggagtcatttgacggctccgttcgggcaaggatag<br>ttactgaccgggaaactgggtcctccaaagggtttggttt<br>tgtagacttcaacagtgaggaggatgccaaagctgccaag<br>gaggccatggaagacggtgaaattgatggaaataaagtta<br>ccttggactgggccaaacctaagggtgaaggtggcttcgg<br>gggtcgtggtggaggcagaggcggctttggaggacgaggt<br>ggtggtagaggaggccgaggaggatttggtggcagaggcc<br>ggggaggctttggagggcgaggaggcttccgaggaggcag<br>aggaggaggaggtgaccacaagccacaaggaaagaagacg<br>aagtttgaagtttaaac |
| 4 | ヒトヌクレオリン欠失構築物のアミノ酸配列であるΔ1～283Nuc(残基1～283を欠く) | MAKQKAAPEAKKQKVEGTEPTTAFNLFVGNLNFNKSA<br>PELKTGISDVFAKNDLAVVDVRIGMTRKFGYVDFESAE<br>DLEKALELTGLKVFGNEIKLEKPKGKDSKKERDARTLL<br>AKNLPYKVTQDELKEVFEDAAEIRLVSKDGKSKGIAYI<br>EFKTEADAEKTFEEKQGTEIDGRSISLYYTGEKGQNQD<br>YRGGKNSTWSGESKTLVLSNLSYSATEETLQEVFEKAT<br>FIKVPQNQNGKSKGYAFIEFASFEDAKEALNSCNKREIE<br>GRAIRLELQGPRGSPNARSQPSKTLFVKGLSEDTTEETL<br>KESFDGSVRARIVTDRETGSSKGFGFVDFNSEEDAKAA<br>KEAMEDGEIDGNKVTLDWAKPKGEGGFGGRGGGRGG<br>FGGRGGGRGGRGGFGGRGRGGFGGRGGFRGGRGGGG<br>DHKPQGKKTKFE |

ヒトヌクレオリンおよびヒトヌクレオリンのＮ末端欠失断片のゲノムコード領域およびタンパク質配列を列挙する。ヌクレオリンはまた、C23、FLJ45706、FLJ59041、およびNCLとしても公知である。

ヒトＮＣＬ遺伝子は、１３のイントロンを伴う１４のエクソンからなり、約１１ｋｂにわたる。ヌクレオリンタンパク質は、その機能を媒介する複数の機能的ドメインを含有する。Ｎ末端部分は、複数のリン酸化部位を含有し、酸性アミノ酸に富む。ヌクレオリンの中央部分は、４つのＲＮＡ結合ドメイン（ＲＢＤ）を包含し、Ｃ末端部分は、グリシンおよびアルギニンに富むドメイン（ＲＧＧドメインまたはＧＡＲドメインと称する）を含有する（Ｆａｒｉｎら、２００９年）。

【００５１】

一実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインを含有するヌクレオリン領域を、単離ヒト抗ヌクレオリン抗体を生成するのに用いる。一実施形態では、残基１～２８３を欠くヌクレオリン領域（配列番号４）を、単離ヒト抗ヌクレオリン抗体を生成するのに用いる。一実施形態では、本発明が、ヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメイン含有部分を特異的に標的とする、ヒト抗ヌクレオリン抗体を提供する。一実施形態では、本発明が、ヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメイン含有部分を特異的に標的とする、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を提供する。一実施形態では、本発明が、ヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメイン含有部分を特異的に標的とする、ヒトＢ細胞を介して生成される単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を提供する。一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体のヌクレオリンとの相互反応により、ヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインの他の分子との相互作用が破壊される。一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体のヌクレオリンとの相互反応により、ヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインのＢＣＬ－２との相互作用が破壊される。

【００５２】

おびただしい量の証拠により、ｍＲＮＡの安定化におけるヌクレオリンの役割が裏付け

られている。ヌクレオリンは、アミロイド前駆体タンパク質ｍＲＮＡの３’側非翻訳領域（３’－ＵＴＲ）に結合し、このｍＲＮＡを安定化させる（ＷｅｓｔｍａｒｋおよびＭａｌｔｅｒ、２００１年）。ヌクレオリンはまた、Ｔ細胞が活性化するときに生じるＩＬ－２　ｍＲＮＡの安定化にも必要とされる（Ｃｈｅｎら、２０００年）。より近年の研究は、ヌクレオリンが、ＨＬ－６０細胞（Ｓｅｎｇｕｐｔａら、２００４年）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）細胞（Ｏｔａｋｅら、２００７年）、ならびにＭＣＦ－７乳癌細胞（Ｓｏｕｎｄａｒａｒａｊａｎら、２００８年）において、ｂｃｌ－２　ｍＲＮＡの３’－ＵＴＲ中のＡ－Ｕに富むエレメント（ＡＲＥ）に結合することを裏付けている。ヌクレオリンのｂｃｌ－２　ＡＲＥへの結合が、それをリボヌクレアーゼによる分解から保護することにより、ｂｃｌ－２　ｍＲＮＡを安定化させる一方、ＭＣＦ－７細胞におけるｓｈＲＮＡによるヌクレオリンのノックダウンは、ｂｃｌ－２　ｍＲＮＡの不安定性、およびｂｃｌ－２タンパク質レベルの低下をもたらす（Ｓｏｕｎｄａｒａｒａｊａｎら、２００８年）。

【００５３】

その膜貫通ドメインまたはシグナル配列の欠如（Ｓｒｉｖａｓｔａｖａら、１９８９年；Ｌａｐｅｙｒｅら、１９８７年）にもかかわらず、ヌクレオリンは、多様な種類の腫瘍細胞の外部表面に存在する（Ｏｔａｋｅら、２００７年；Ｓｏｕｎｄａｒａｒａｊａｎら、２００８年；Ｃｈｅｎら、２００８年；Ｈｏｖａｎｅｓｓｉａｎら、２０００年；ＳｉｎｃｌａｉｒおよびＯ’Ｂｒｉｅｎ、２００２年）。結果は、ヌクレオリンが、ＭＶ４－１１細胞からも、Ｋ－５６２細胞からも、組織培養培地へは分泌されないことを示す（Ｓｏｕｎｄａｒａｒａｊａｎら、２００９年）。これは、細胞表面におけるヌクレオリンの存在が、分泌されたヌクレオリンが、高分子を介して、腫瘍細胞の細胞表面に吸着した結果ではないことを教唆する。また一方で、ヌクレオリンは、広範な翻訳後修飾を経る（Ｓｒｉｖａｓｔａｖａら、１９８９年；Ｌａｐｅｙｒｅら、１９８７年）。ヌクレオリンは、多様な種類の増殖細胞表面から、糖リンタンパク質として単離されている（Ｈｏｖａｎｅｓｓｉａｎら、２０００年；ＰｆｅｉｆｌｅおよびＡｎｄｅｒｅｒ、１９８３年）。また、ヌクレオリンがパルミトイル化、プレニル化、またはミリストイル化することにより、このタンパク質の疎水性領域が細胞膜へと挿入または固定されることが可能となりうる場合もある。ヌクレオリンは、細胞膜と核との間のシャトルタンパク質として機能すると考えられる（Ｈｏｖａｎｅｓｓｉａｎら、２０００年）。増殖しつつある腫瘍細胞内では、ヌクレオリンが、細胞膜から陥入するエンドサイトーシス小胞と会合することが多い（Ｈｏｖａｎｅｓｓｉａｎら、２０００年）。これらの小胞内でヌクレオリンに結合するリガンドは、温度依存的な過程により内部化されるので、ヌクレオリンはまた、多様なリガンドに対する細胞表面受容体としても作用する。例えば、細胞膜のヌクレオリンは、Ｅ．ｃｏｌｉのインチミンγ（ＳｉｎｃｌａｉｒおよびＯ’Ｂｒｉｅｎ、２００２年）、抗ＨＩＶ剤であるミッドカイン（Ｓａｉｄら、２００２年）、ラミニン１（Ｋｉｂｂｅｙら、１９９５年）、ＤＮＡナノ粒子（Ｃｈｅｎら、２００８年）、ならびに抗血管新生性シュードペプチドであるＨＢ－１９（Ｄｅｓｔｏｕｃｈｅｓら、２００８年）の受容体として機能することが報告されている。ヌクレオリンは、指数関数的に増殖する真核細胞におけるリボソームの生合成および成熟に関与する核内の重要なタンパク質である。この点において、ヌクレオリンの１つの重要な機能は、ＲＮＡのプロセシングおよび他の細胞生物学的過程に関与する、細胞質と核との間におけるシャトルタンパク質としての機能である。正常な細胞生理において、ヌクレオリンは、主に、核および細胞質に局在化しているが、ある状態下、とりわけ、多様な疾患状態ではまた、ヌクレオリンが、リン酸化形態で細胞表面に存在することも示されている。この点において、細胞膜におけるヌクレオリンは、細胞の増殖、分化、接着、有糸分裂誘発、および血管新生を駆動する多様なリガンドに対する結合タンパク質として働く。

【００５４】

Ｂ．癌におけるヌクレオリン

複数の系列の証拠により、ヌクレオリンが、抗体ベースの免疫療法のための優れた腫瘍

抗原であることが教唆されている。ヌクレオリンは、ヒト慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）細胞（Ｏｔａｋｅら、２００７年）、ヒト急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）細胞（Ｓｏｕｎｄａｒａｒａｊａｎら、２００８年）、および乳癌細胞（Ｓｏｕｎｄａｒａｒａｊａｎら、２００８年）を含めた、多様なヒト腫瘍の細胞膜および細胞質では過剰発現するが、正常ＣＤ１９＋　Ｂ細胞（Ｏｔａｋｅら、２００７年）でも、正常ＣＤ３３＋骨髄細胞（Ｇａｔｔｏｎｉ－Ｃｅｌｌｉら、２００９年）でも、正常哺乳動物内皮細胞（Ｓｏｕｎｄａｒａｒａｊａｎら、２００８年）でも過剰発現しない。患者に由来するＡＭＬ骨芽細胞を、ＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスに移植すると、細胞膜および細胞質において強いヌクレオリン染色が示される一方、正常マウスの骨髄細胞および脾臓内のリンパ球が、ヌクレオリンについて陰性であった（Ｇａｔｔｏｎｉ－Ｃｅｌｌｉら、２００９年）ことは興味深い。

【００５５】

ヌクレオリン標的化アプタマーであるＡＳ１４１１は、ヒトヌクレオリンを標的とする。近年、ヒトＭＶ４－１１白血病細胞では、細胞膜のヌクレオリンが、ＡＳ１４１１の受容体であることが報告された（Ｓｏｕｎｄａｒａｒａｊａｎら、２００９年）。

【００５６】

ＡＳ１４１１は、腫瘍細胞の外部表面で過剰発現しているヌクレオリンに結合し、ヌクレオリンが細胞膜から細胞質および核へとシャトリングするときに細胞内に侵入する。ＡＳ１４１１は、ヌクレオリンを過剰発現する広範な癌細胞系のセットにおいて、抗増殖活性を呈示することが示されている（表２）。

【００５７】

【表２】

表 2: ヌクレオリンを過剰発現し、かつ/またはヌクレオリンが阻害された後に死滅する癌細胞系

| 癌型: | 細胞系: |
|---|---|
| 肺癌 | A549, NCI-H322M, NCI-H460, EKVX, HOP-92, NCI-H299, CaLu1, NCI-H1385, NCI-H82, CaLu6 |
| 乳癌 | MCF7, T-47D, BT-549, MDA-N, MDA-MB-231, ZR7S-1 |
| 前立腺癌 | DU145, PC-3, CA-HPV-10 |
| 結腸癌 | HCC 2998, HT-29, KM12, HCT-116, SW620, HCT-15, LS174T |
| 膵臓癌 | PANC-1, MIA-PaCa-2, PANC-1 |
| 腎細胞癌 | 786-0, CAKI-1, RXF393, TK10, A498, ACHN, SN12C |
| 卵巣癌 | IGROV, OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-5 |
| 子宮頚癌 | HeLa |
| 白血病およびリンパ腫 | CCRF-CEM, SR, HL60, K-562, RPMI-6226, U937, Meg0, MV4-11 |
| 黒色腫 | LOX-IMVI, SK-MEL-2, A375, SK-MEL-28, MDA-MB-435 |
| 膠芽腫 | SF-268, U87-MG |
| 神経芽腫 | IMR 32, Lan 5 |
| 肉腫 | HT-1080 |
| 胃癌 | KATOIII, HGC27 |

NCI による、AS1411 についての、腫瘍細胞系スクリーニングによるデータ(6.3 μM における≧50%の増殖阻害)(Bates ら、2009 年)

また、抗ヌクレオリン抗体も、細胞表面ヌクレオリンに結合した後は、細胞膜ヌクレオリンのシャトル機能を利用し、内部化されうる。本出願では、ヌードマウスまたはｍａｔｒｉｇｅｌプラグにおいて増殖させたヒト腫瘍血管内皮細胞を、抗ヌクレオリンポリクローナル抗体と共にインキュベートすると、ｂｃｌ－２　ｍＲＮＡレベルの下方制御ならびにアポトーシスの誘導が結果としてもたらされるという所見（Ｆｏｇａｌら、２００９年

）が重要である。これにより、抗ヌクレオリン抗体が、細胞内機構を介して抗腫瘍効果を誘発することも可能であり、かつ／または抗体依存性細胞性細胞傷害作用（ＡＤＣＣ）および補体依存性細胞性細胞傷害作用（ＣＤＣＣ）を誘発することも可能であることが教唆される。

【００５８】

Ｃ．抗体またはそれらの断片

一実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片により、本明細書で開示される方法のうちのいずれかを実施することができる。一実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片を用いて、その表面においてヌクレオリンを発現する細胞を検出する。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片を用いて、その表面においてヌクレオリンを発現する細胞を阻害するかまたは死滅させる。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片を用いて、新生物性疾患（例えば、癌）、自己免疫疾患、炎症性疾患もしくは炎症性状態、呼吸器疾患、ウイルス感染、または黄斑変性を治療または予防する。

【００５９】

一実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片を、毒素、化学療法剤、免疫刺激性核酸配列（例えば、ＣｐＧ配列）、放射性核種、または免疫療法剤にコンジュゲートするか、連結するか、または融合させる。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片を、放射性核種、フルオロフォア、化学発光化合物、蛍光化合物、または酵素にコンジュゲートするか、連結するか、または融合させる。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片を用いて、その表面においてヌクレオリンを発現する細胞に接触させる。一実施形態では、細胞が、前癌性細胞、癌細胞、または免疫細胞である。

【００６０】

一実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗ヌクレオリン抗体または断片である。一実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、非ヒト抗ヌクレオリン抗体またはその断片である。一実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、キメラ抗ヌクレオリン抗体またはその断片である。一実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト化抗ヌクレオリン抗体またはその断片である。

【００６１】

一実施形態では、抗ヌクレオリン抗体断片を、抗ヌクレオリン抗体から生成する。一実施形態では、抗ヌクレオリン抗体断片のヒトヌクレオリンに対する結合特異性が、親抗体と同じである。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体断片のヒトヌクレオリンに対する結合特異性が、親抗体と比較して向上している。一実施形態では、抗ヌクレオリン抗体断片のヒトヌクレオリンに対する結合アフィニティーが、親抗体と同じである。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体断片のヒトヌクレオリンに対するアフィニティーが、親抗体と比較して向上している。一実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその結合断片が、ヒト抗ヌクレオリン抗体断片である。

【００６２】

抗体断片は、好ましくはその抗原結合領域を含む、完全抗体の部分を含む。抗体断片の例には、Ｆａｂ断片、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、およびＦｖ断片；ダイアボディー；直鎖状抗体；単鎖抗体分子；ならびに抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれる。

【００６３】

抗体のパパイン消化は、各々が、単一の抗原結合部位と、それが容易に結晶化する能力をその名称が反映する、残りの「Ｆｃ」断片とを伴う、「Ｆａｂ」断片と呼ばれる２つの同一な抗原結合断片を生成させる。ペプシン処理は、２つの抗原結合部位を有し、抗原を架橋することがなおも可能である、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片をもたらす。

【００６４】

「Ｆｖ」とは、完全な抗原結合部位を含有する最小の抗体断片である。一実施形態では、二本鎖Ｆｖ分子種が、非共有結合により密に会合する、１つの重鎖可変ドメインと１つの軽鎖可変ドメインとからなる。単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）分子種では、軽鎖と重鎖とが、二

本鎖Ｆｖ分子種における構造と類似の「二量体」構造で会合しうるように、１つの重鎖可変ドメインと１つの軽鎖可変ドメインとを、可撓性のペプチドリンカーを介して、共有結合により連結することができる。各可変ドメインの３つのＨＶＲが相互作用して、ＶＨ－ＶＬ二量体の表面において抗原結合部位を規定するのは、この立体構造においてである。６つのＨＶＲにより集合的に、抗原結合特異性が抗体に賦与される。しかし、結合部位の全体より低度のアフィニティーではあるが、単一の可変ドメイン（または抗原に特異的な３つのＨＶＲだけを含む、Ｆｖの半分）にもなお、抗原を認識し、これに結合する能力がある。

【００６５】

Ｆａｂ断片は、重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインとを含有し、また、軽鎖の定常ドメイン、および重鎖の第１の定常ドメイン（ＣＨ１）も含有する。Ｆａｂ’断片は、抗体のヒンジ領域に由来する１または複数のシステインを含めた、重鎖ＣＨ１ドメインのカルボキシ末端における数個の残基が付加されていることにより、Ｆａｂ断片とは異なる。本明細書では、Ｆａｂ’－ＳＨを、定常ドメインのシステイン残基（複数可）が遊離チオール基を保有するＦａｂ’の呼称とする。Ｆ（ａｂ’）$_2$抗体断片は元来、それらの間にヒンジ領域のシステインを有するＦａｂ’断片の対として生成された。また、抗体断片の他の化学的な連結についても公知である。

【００６６】

「単鎖Ｆｖ」抗体断片または「ｓｃＦｖ」抗体断片は、抗体のＶＨドメインおよびＶＬドメインを含み、これらのドメインを、単一のポリペプチド鎖内に存在させる。一般に、ｓｃＦｖポリペプチドは、ＶＨドメインとＶＬドメインとの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、該ｓｃＦｖが、抗原に対する結合に所望される構造を形成することを可能とする。ｓｃＦｖの総説については、例えば、Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ、「Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ」、１１３巻；ＲｏｓｅｎｂｕｒｇおよびＭｏｏｒｅ編（Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９９４年）、２６９～３１５頁を参照されたい。

【００６７】

「ダイアボディー」という用語は、同じポリペプチド鎖（ＶＨ－ＶＬ鎖）において、軽鎖可変ドメイン（ＶＬドメイン）に連結された重鎖可変ドメイン（ＶＨドメイン）を含む、２つの抗原結合部位を伴う抗体断片を指す。同じ鎖上の２つのドメイン間における対合を可能とするには短すぎるリンカーを用いることにより、該ドメインを、別の鎖の相補的ドメインと対合させ、２つの抗原結合部位を創出する。ダイアボディーは、二価または二重特異性でありうる。ダイアボディーは、例えば、ＥＰ４０４，０９７；ＷＯ１９９３／０１１６１；Ｈｕｄｓｏｎら、Ｎａｔ． Ｍｅｄ．、９巻：１２９～１３４頁（２００３年）；およびＨｏｌｌｉｎｇｅｒら、ＰＮＡＳ ＵＳＡ、９０巻：６４４４～６４４８頁（１９９３年）においてより十分に説明されている。また、Ｈｕｄｓｏｎら、Ｎａｔ．Ｍｅｄ．、９巻：１２９～１３４頁（２００３年）では、トリアボディーおよびテトラボディーも説明されている。

【００６８】

本明細書で用いられる「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指す、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、可能な突然変異、例えば、わずかな量で存在しうる天然の突然変異を除いて同一である。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、異なる抗体の混合物ではない抗体の特徴を指す。ある実施形態では、このようなモノクローナル抗体が、複数のポリペプチド配列から単一の標的に結合するポリペプチド配列を選択することを包含する工程により得られた、標的に結合するポリペプチド配列を含む抗体を包含することが典型的である。例えば、該選択工程は、ハイブリドーマクローン、ファージクローン、または組換えＤＮＡクローンなど、複数のクローンから固有のクローンを選択することでありうる。選択された標的結合配列をさらに改変して、例えば、標的に対するアフィニティーを改善し、標的結合配列をヒト化し、細胞培養物におけるその生成を改善し、ｉｎ ｖｉｖｏにおけるその免疫原性を低減し

、多重特異性抗体を創出することなどが可能であり、該改変された標的結合配列を含む抗体もまた、本発明のモノクローナル抗体であることを理解されたい。異なる決定基（エピトープ）を指向する異なる抗体を包含することが典型的なポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原における単一の決定基を指向する。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体調製物は、他の免疫グロブリンが混入していないのが典型的である点で有利でありうる。

【００６９】

「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均一な抗体集団から得られるものとしての抗体の特徴を示すものであり、何らかの特定の方法による抗体の生成を要請するものとしては見なされないものとする。例えば、本発明に従って用いられるモノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドーマ法（例えば、ＫｏｈｌｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎ、Ｎａｔｕｒｅ、２５６巻：４９５～９７頁（１９７５年）；Ｈｏｎｇｏら、Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ、１４巻（３号）：２５３～２６０頁（１９９５年）；Ｈａｒｌｏｗら、「Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：　Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ」、（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ、２版、１９８８年）；Ｈａｍｍｅｒｌｉｎｇら、「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　ａｎｄ　Ｔ－Ｃｅｌｌ　Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ」、５６３～６８１頁（Ｅｌｓｅｖｉｅｒ、Ｎ．Ｙ．、１９８１年））；組換えＤＮＡ法（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号を参照されたい）；ファージディスプレイ法（例えば、Ｃｌａｃｋｓｏｎら、Ｎａｔｕｒｅ、３５２巻：６２４～６２８頁（１９９１年）；Ｍａｒｋｓら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２２２巻：５８１～５９７頁（１９９２年）；Ｓｉｄｈｕら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、３３８巻（２号）：２９９～３１０頁（２００４年）；Ｌｅｅら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、３４０巻（５号）：１０７３～１０９３頁（２００４年）；Ｆｅｌｌｏｕｓｅ、ＰＮＡＳ　ＵＳＡ、１０１巻（３４号）：１２４６７～１２４７２頁（２００４年）；ならびにＬｅｅら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ、２８４巻（１～２号）：１１９～１３２頁（２００４年）を参照されたい）；ならびにヒト免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子座またはヒト免疫グロブリン遺伝子のうちの一部または全部を有する動物においてヒト抗体またはヒト様抗体を生成する技法（例えば、ＷＯ１９９８／２４８９３；ＷＯ１９９６／３４０９６；ＷＯ１９９６／３３７３５；ＷＯ１９９１／１０７４１；Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓら、ＰＮＡＳ　ＵＳＡ、９０巻：２５５１頁（１９９３年）；Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓら、Ｎａｔｕｒｅ、３６２巻：２５５～２５８頁（１９９３年）；Ｂｒｕｇｇｅｍａｎｎら、Ｙｅａｒ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．、７巻：３３頁（１９９３年）；米国特許第５，５４５，８０７号；同第５，５４５，８０６号；同第５，５６９，８２５号；同第５，６２５，１２６号；同第５，６３３，４２５号；および同第５，６６１，０１６号；Ｍａｒｋｓら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１０巻：７７９～７８３頁（１９９２年）；Ｌｏｎｂｅｒｇら、Ｎａｔｕｒｅ、３６８巻：８５６～８５９頁（１９９４年）；Ｍｏｒｒｉｓｏｎ、Ｎａｔｕｒｅ、３６８巻：８１２～８１３頁（１９９４年）；Ｆｉｓｈｗｉｌｄら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．　１４巻：８４５～８５１頁（１９９６年）；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．　１４巻：８２６頁（１９９６年）；ならびにＬｏｎｂｅｒｇおよびＨｕｓｚａｒ、Ｉｎｔｅｒｎ．　Ｒｅｖ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１３巻：６５～９３頁（１９９５年）を参照されたい）を含めた各種の技法により作製することができる。

【００７０】

「ポリクローナル」という修飾語は、抗体の均一でない集団による供給源から得られるものとしての抗体の特徴を示す。ポリクローナル抗体は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０の抗体など、複数の抗体を含む。

【００７１】

本明細書におけるモノクローナル抗体は、ヒト抗体、非ヒト抗体、ヒト化抗体、および「キメラ」抗体を包含する。「キメラ」抗体とは、重鎖および／または軽鎖の部分が、特定の種に由来する抗体における対応する配列、または特定の抗体クラスもしくはサブクラ

スに属する抗体における対応する配列と同一であるかまたは相同である一方で、該鎖（複数可）の残りは、それらが所望の生物学的活性を呈示する限りにおいて、別の種に由来する抗体における対応する配列、または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体、ならびにこのような抗体の断片における対応する配列と同一であるかまたは相同である抗体である（米国特許第４，８１６，５６７号；およびＭｏｒｒｉｓｏｎら、ＰＮＡＳ ＵＳＡ、８１巻：６８５１～６８５５頁（１９８４年））。キメラ抗体には、その抗原結合領域が、例えば、マカクザルを対象の抗原で免疫化することにより生成される抗体に由来する、ＰＲＩＭＡＴＩＺＥＤ．ＲＴＭ抗体が含まれる。

【００７２】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態とは、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含有するキメラ抗体である。大部分において、ヒト化抗体は、その中のレシピエントの超可変領域に由来する残基が、所望の特異性、アフィニティー、および能力を有する、マウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長動物など、ヒト以外の種の抗体（ドナー抗体）の超可変領域に由来する残基により置換されているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（ＦＲ領域）の残基も、対応する非ヒト残基により置換されている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見出されない残基を含む場合がある。これらの修飾を施して、抗体の効能をさらに洗練させる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも１つであり、典型的には２つである可変ドメインのうちの実質的に全部を含むものであろう。この中の超可変ループのうちの全部または実質的に全部が、非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、ＦＲのうちの全部または実質的に全部が、ヒト免疫グロブリン配列によるＦＲである。ヒト化抗体は、場合によってまた、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ領域）、典型的にはヒト免疫グロブリンのＦｃ領域のうちの少なくとも一部も含む。さらなる詳細については、Ｊｏｎｅｓら、Ｎａｔｕｒｅ、３２１巻：５２２～５２５頁（１９８６年）；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎら、Ｎａｔｕｒｅ、３３２巻：３２３～３２９頁（１９８８年）；およびＰｒｅｓｔａ、Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．、２巻：５９３～５９６頁（１９９２年）を参照されたい。また、これらの文献において引用されている以下の総説論文および参考文献：ＶａｓｗａｎｉおよびＨａｍｉｌｔｏｎ、Ａｎｎ．Ａｌｌｅｒｇｙ，Ａｓｔｈｍａ＆Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１巻：１０５～１１５頁（１９９８年）；Ｈａｒｒｉｓ、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｔｒａｎｓａｃｔｉｏｎｓ、２３巻：１０３５～１０３８頁（１９９５年）；ＨｕｒｌｅおよびＧｒｏｓｓ、Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．、５巻：４２８～４３３頁（１９９４年）も参照されたい。

【００７３】

「ヒト抗体」とは、ヒトが生成させる抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を保有し、かつ／または本明細書で開示される、ヒト抗体を作製する技法のうちのいずれかを用いて生成された抗体である。ヒト抗体のこの定義はとりわけ、非ヒト抗原に結合する残基を含むヒト化抗体を除外する。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーを含め、当技術分野において公知である各種の技法を用いて生成することができる（ＨｏｏｇｅｎｂｏｏｍおよびＷｉｎｔｅｒ、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２２７巻：３８１頁（１９９１年）；Ｍａｒｋｓら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２２２巻：５８１頁（１９９１年））。ヒトモノクローナル抗体を調製するにはまた、Ｃｏｌｅら、「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ」、Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ、７７頁（１９８５年）；Ｂｏｅｒｎｅｒら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１４７巻（１号）：８６～９５頁（１９９１年）において説明されている方法も利用可能である。また、ｖａｎ Ｄｉｊｋおよびｖａｎ ｄｅ Ｗｉｎｋｅｌ、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．、５巻：３６８～７４頁（２００１年）も参照されたい。ヒト抗体は、抗原感作に応答してこのような抗体を生成するように改変され、その内因性遺伝子座が無効化されているトランスジェニック動物、例えば、免疫化クセノマウス（例えば、ＸＥＮＯＭＯＵＳＥ（商標）法については、米国特許第６，０７５，１８１号およ

び同第６，１５０，５８４号を参照されたい）に抗原を投与することにより、調製することができる。また、ヒトＢ細胞ハイブリドーマ法により生成させるヒト抗体については、例えば、Ｌｉら、ＰＮＡＳ　ＵＳＡ、１０３巻：３５５７～３５６２頁（２００６年）も参照されたい。

【００７４】

ＩＩ．ＩｇＭ$^{+}$Ｂ細胞からヒトモノクローナル抗体の調製

以下は、ヌクレオリンに対するヒトモノクローナル抗体を得る一般的な手順についての説明である。これらの手順は例示的なものであり、本発明の本質的な態様を保持しながら、これらを改変することができる。

【００７５】

Ａ．ＩｇＭ$^{+}$Ｂ細胞集団の取得

扁桃腺からＢ細胞を調製するには、扁桃腺組織を抗体と混合し、約１ｍｍ$^{3}$の小片へと切り刻み、かつ、みじん切りにした後、これを静かに磨り潰し、ナイロン製のろ過器によりろ過する。次いで、懸濁液を、Ｆｉｃｏｌｌクッション上で遠心分離する。単核細胞を含有する境界層を抽出し、洗浄し、ＤＰＢＳ中に再懸濁させる。抗体および磁気ビーズを用いる陰性選択により、さらなる濃縮（＞９５％）を達成することができる。

【００７６】

非ヒト哺乳動物キメラ抗体、非ヒト哺乳動物ポリクローナル抗体（例えば、非ヒト哺乳動物ポリクローナル血清）および／または非ヒト哺乳動物モノクローナル抗体（Ｍａｂ）ならびにこれらの断片（例えば、タンパク質分解的な消化または融合によるそれらのタンパク質生成物）は、ある疾患を治療しようとする試みにおいて用いられることが多い潜在的な治療剤である。しかし、このような抗体または断片は、ヒトに投与されると免疫反応を誘発する可能性がある。このような免疫反応は、抗体または断片が、免疫複合体を介して循環からクリアランスされる結果をもたらし、反復投与を治療に不適なものとし、これにより、患者に対する治療的利益を減殺し、かつ、該抗体または断片の再投与を制限する可能性がある。例えば、非ヒト部分を含む抗体または断片の反復投与は、血清病および／またはアナフィラキシーをもたらす可能性がある。これらの問題ならびに他の問題を回避する目的で、キメラ化およびヒト化を含め、このような抗体ならびにそれらの部分の免疫原性を低減する多数の手法が講じられている。しかし、これらの手法および他の手法もなお、ある程度の免疫原性、アフィニティーの低下、アビディティーの低下、もしくは細胞培養、スケールアップ、生成に伴う問題、ならびに／または収量の低下を示す抗体または断片を結果としてもたらしうる。したがって、このような抗体または断片が、治療タンパク質として製造または使用されるための適性は、理想に満たないものでありうる。したがって、ヒト細胞から発現する抗体は、これらの問題の多くを回避することが可能であり、ヒトに対して実質的に非免疫原性でありうる。本明細書で用いられる「免疫原性」とは、免疫反応を誘発する能力を保有することを指す。

【００７７】

一実施形態では、ヒトＢ細胞により発現させたヒト抗ヌクレオリン抗体が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。一実施形態では、ヒトＢ細胞により発現される単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。

【００７８】

末梢血からＢ細胞を調製するには、凝血を防止するためにヘパリンナトリウムを含有するシリンジ内に静脈血を吸引し、これを希釈し、Ｆｉｃｏｌｌクッション上で遠心分離する。単核細胞を含有する境界層を抽出し、洗浄し、ＤＰＢＳ中に再懸濁させる。さらなる濃縮は、上記で述べた通りに達成することができる。

【００７９】

Ｂ．ＥＢＶによる不死化

ＥＢＶ上清の接種により感染させるため、Ｂ細胞を、完全ＲＰＭＩ培地中に１ｍｌ当たりの細胞１０$^{6}$～１０$^{7}$個で再懸濁させ、等容量の濾過されたＥＢＶ上清と混合し、次いで、３７℃および５％$CO_2$で４時間にわたりインキュベートする。感染細胞を所望の濃

度（一般には、１ｍｌ当たりの細胞１０$^{5}$～１０$^{6}$個）で細胞培養物中に再懸濁させるように、完全ＲＰＭＩ培地を添加することにより、培養物容量を調整することができる。次いで、細胞をマルチウェルプレート内に分散させ、３７℃および５％ＣＯ$_{2}$の組織培養インキュベーターへと移す。

【００８０】

スピンフェクションするには、Ｂ細胞を完全ＲＰＭＩ培地中に１ｍｌ当たりの細胞１０$^{6}$～１０$^{7}$個で再懸濁させ、限外濾過により１０倍に濃縮した等容量のＥＢＶと混合し、６ウェルの組織培養プレートに入れる。次いで、プレートを、周囲温度、９００ｇで１時間にわたり遠心分離し、このとき、感染細胞を、所望の濃度（一般には、１ｍｌ当たりの細胞１０$^{5}$～１０$^{6}$個）で完全ＲＰＭＩ培地中に再懸濁させ、マルチウェルプレート内に分散させ、３７℃および５％ＣＯ$_{2}$の組織培養インキュベーターへと移す。

【００８１】

場合によっては、感染時または感染後において、Ｂ細胞を、Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）リガンドと接触させることもできる。ＴＬＲリガンドは、以下の最終濃度：Ｐａｍ３ＣＳＫ４（０．１～１μｇ／ｍｌ）、Ｚｙｍｏｓａｎ（１～１０μｇ／ｍｌ）、ポリＩ：Ｃ（１～２５μｇ／ｍｌ）、ＬＰＳ（１～５μｇ／ｍｌ）、Ｉｍｉｑｕｉｍｏｄ（１μｇ／ｍｌ）、および／またはＣｐＧ（１～１０μｇ／ｍｌ）で添加することができる。

【００８２】

感染性は、感染経路に応じて変化する。ＥＢＶ上清を接種して扁桃腺Ｂ細胞を感染させることにより、約１～５％のＢ細胞を結果として不死化させる。ＴＬＲリガンドを添加すると、感染効率がほぼ倍増する。濃縮したウイルスをスピンフェクションにより扁桃腺Ｂ細胞に感染させると、２４時間後の感染効率が、事実上１００％増大する。

【００８３】

Ｃ．免疫グロブリンアイソタイプのクラススイッチおよびＩｇＧの分泌を誘導するための培養

Ｂ細胞の分化、免疫グロブリンアイソタイプのクラススイッチ、および／またはＩｇＧの分泌を誘導するため、ＥＢＶを感染させたＢ細胞に、サイトカインならびに他のシグナル伝達剤を、感染の直後、感染の１６～２０時間後、および／または１週間間隔で逐次的に（２、３、４、または５回にわたり）添加する。薬剤は、培地中で希釈し、以下の最終濃度：組換えヒトインターロイキン（ＩＬ）であるＩＬ－４、０．２ｎｇ／ｍｌ；ＩＬ－５、０．２ｎｇ／ｍｌ；ＩＬ－６、０．１ｎｇ／ｍｌ；ＩＬ－９、０．２ｎｇ／ｍｌ；ＩＬ－１０、０．２４ｎｇ／ｍｌ；ＩＬ－１３、１ｎｇ／ｍｌ；組換えヒトインターフェロン－α２ａ（ＩＦＮ－α２ａ）、２，０００ＩＵ／ｍｌ；組換えヒトＢＡＦＦ、１ｎｇ／ｍｌ；組換えヒト可溶性ＣＤ４０Ｌ、５ｎｇ／ｍｌ；ヤギ抗ヒトＩｇＭ Ｆ（ａｂ’）$_{2}$、１．４μｇ／ｍｌ（量は概数である）で細胞に添加することができる。具体的な組合せは、抗ＩｇＭ Ｆ（ａｂ’）$_{2}$、ＣＤ４０Ｌ＋／－ＢＡＦＦ；抗ＩｇＭ Ｆ（ａｂ’）$_{2}$、ＩＬ－６＋／－ＢＡＦＦ；抗ＩｇＭ Ｆ（ａｂ’）$_{2}$、ＣＤ４０Ｌ、ＩＬ－６＋／－ＢＡＦＦ；抗ＩｇＭ Ｆ（ａｂ’）$_{2}$、ＣＤ４０Ｌ、ＩＬ－６＋／－ＩＬ４；ならびに抗ＩｇＭ Ｆ（ａｂ’）$_{2}$、ＣＤ４０Ｌ、およびＩＬ－９＋／－ＩＬ－１３を含む。

【００８４】

免疫グロブリンアイソタイプのクラススイッチの開始は、サイトカイン／増殖因子／シグナル伝達剤カクテルへの曝露の５日後という早い時点で検出することができ、この工程を、以後の１０日間にわたり継続させる。

【００８５】

Ｄ．不死化Ｂ細胞の選択

サイトカイン／増殖因子／シグナル伝達剤カクテルへの曝露後、毎週約１回、または感染後１０～２０日目において、不死化された扁桃腺および血中Ｂ細胞による培養物から培養物上清を回収し、プールし、ＥＬＩＳＡ、あるいはドットブロット、もしくはフローサイトメトリー、ウェスタンブロッティング、または機能的活性の阻害／促進など、他のスクリーニングフォーマットを用いてこれらを調べる。抗原を、ポリスチレン製（例えば、

９６ウェル）プレートのウェルへと、直接的に、または捕捉抗体を介して、例えば、一晩にわたり、結合させることができる。次いで、プレートを洗浄し、ブロッキングし、３連または他の連数で、不死化Ｂ細胞培養物上清試料または対照試料と接触させる。その後、プレートを十分に洗浄し、次いで、例えば、比色基質であるｐ－ニトロフェニルリン酸二ナトリウム塩によるアルカリホスファターゼの転換を介して結合したＩｇＧを検出するために、（ＡＰ）結合ヤギ抗ヒトＩｇＧまたは他の標識二次抗体を添加する。

【００８６】

上記の議論に基づくなら、免疫グロブリンアイソタイプのクラススイッチおよび／またはＩｇＧの分泌は、サイトカイン／増殖因子／シグナル伝達剤カクテルに曝露した直後に開始され、曝露の５日後という早い時点でこれを検出することができる。上清中のＩｇＧレベルは、以後の１０日間にわたり上昇する。したがって、約７～２１日後、約１０～２１日後、約７～１０日後、もしくは約１０～１４日後、または７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、または２１日後に、免疫グロブリンアイソタイプのクラススイッチを経て、ＩｇＧを分泌するＢ細胞を選択する。

【００８７】

ＩＩＩ．ヒトＩｇの軽鎖および重鎖のクローニングおよび発現

ヒト免疫グロブリンの軽鎖配列および重鎖配列をクローニングし、発現させるには、各種の方法を使用することができる。参照により本明細書に組み込まれるＷｅｌｔｓｃｈｏｆら（１９９５年）は、本発明者らにより用いられる方法について詳細に説明している。可変領域をクローニングすることもでき、可変領域＋定常領域をクローニングすることもできる。

【００８８】

また、Ｔａｋｅｋｏｓｈｉら（２００１年）により説明される技法など、他の技法も有用である。この参考文献では、市販のキット（ＲＮｅａｓｙ ｍｉｎｉ ｋｉｔ、Ｑｉａｇｅｎ）を用いて、ペレット化させた細胞から、細胞内全ＲＮＡが単離された。ランダムの９マー、ヌクレオチド、および逆転写酵素（大津、タカラバイオ株式会社、ＲＮＡ－ＰＣＲキット）を用いてｃＤＮＡを合成し、ヒト免疫グロブリン（Ｉｇ）に特異的な重鎖および軽鎖のプライマーを伴うポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）により、これらを増幅した。「タッチダウン」ＰＣＲプロトコールを使用した、すなわち、各々が、９５℃で１分間にわたる変性、１分間にわたるアニーリング、および７２℃で２分間にわたる伸長の３サイクルずつの、計１１サイクルにわたるプロトコールを使用した。アニーリング温度は、６５～５５℃にわたり、１℃ずつの階差で変化させた。タッチダウンサイクルの後、５５℃のアニーリング温度を用いる２５サイクルを施した。結果として得られるＰＣＲ産物を、アガロース中でゲル精製し、Ｑｉａｑｕｉｃｋスピンカラム（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて抽出した。次いで、軽鎖遺伝子および重鎖Ｆｃ遺伝子を、発現ベクターであるｐＦａｂ１－Ｈｉｓ２のＮｈｅＩ／ＡｓｃＩ部位およびＳｆｉＩ／ＮｏｔＩ部位にクローニングした。軽鎖（κおよびλ）遺伝子および重鎖Ｆｃ（γおよびμ）遺伝子と共にライゲーションされたｐＦａｂ１－Ｈｉｓ２ベクターを、コンピテントのＥ．ｃｏｌｉ ＪＭ１０９細胞（大阪、東洋紡バイオロジックス株式会社）へと導入した。形質転換後、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞を、Ｌｕｒｉａ－Ｂｅｒｔａｎｉ（ＬＢ）／アンピシリン（５０μｇ／ｍｌ）培地プレートへと播種した。単離された細菌コロニーを、アンピシリン（５０μｇ／ｍｌ）および$MgCl_2$（１．５ｍＭ）を伴うＳｕｐｅｒ Ｂｒｏｔｈ（ＳＢ）２ｍｌ中、３０℃でインキュベートした。イソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）を用いて、Ｆａｂタンパク質の生成を誘導した。細菌培養物に由来する細胞をペレット化させ、プロテアーゼ阻害剤カクテル（Ｃｏｍｐｌｅｔｅ；Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ、Ｍａｎｎｈｅｉｍ）を伴うＢ－ＰＥＲ（Ｐｉｅｒｃｅ）０．３ｍｌ中に再懸濁させ、室温で５分間にわたり振とうした。細胞溶解物を１５，０００Ｇで１０分間にわたり遠心分離し、結果として得られる、抗体のＦａｂ部分を含有する上清を回収した。

【００８９】

前出は、純粋に例示的なものであり、他の方法を使用することもできる。

【００９０】
ＩＶ．抗体の生成
ヒト軽鎖およびヒト重鎖の核酸をクローニングしたら、これを適切な発現ベクター内に挿入し、抗体の生成を支援する宿主細胞（例えば、抗体生成細胞）へと導入する。生成のために意図される具体的な細胞系は、２９３細胞、ＣＨＯ細胞、ＣＯＳ細胞、またはそれらの一部がＩｇＧを欠く、骨髄腫細胞の各種の形態である。２つの基本的な方法により、これらの細胞をヒトｍＡｂの生成に利用することができる。第１の方法では、骨髄腫細胞または不死化細胞を、元の融合細胞に体細胞および骨髄腫細胞を供給するのに用いた種類である、組織適合性の動物（例えば、同系マウス）へと注射（腹腔内注射であることが多い）することもでき、非適合細胞を注射する場合には、免疫不全動物へと注射することもできる。場合によって、注射前に、炭化水素、とりわけ、プリスタン（テトラメチルペンタデカン）などの油により動物をプライミングする。注射された動物は、トランスフェクトされた骨髄腫が生成させる特異的なモノクローナル抗体を分泌する腫瘍を発生させる。次いで、血清または腹水など、該動物の体液を採取して、ヒトＭＡｂを高濃度でもたらすことができる。第２の方法では、個々の細胞系をｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養することができ、この場合、ヒトＭＡｂを培養培地中に自然に分泌させ、この培地から、ヒトＭＡｂを高濃度で容易に得ることができる。
【００９１】
いずれかの手段により生成させたヒトＭＡｂは、所望の場合、濾過、遠心分離、およびＨＰＬＣまたはアフィニティークロマトグラフィーなど、各種のクロマトグラフィー法を用いてさらに精製することができる。このようにして生成させたモノクローナル抗体から、ペプシンもしくはパパインなどの酵素による消化、および／または化学的還元によるジスルフィド結合の切断が含まれる方法を介して、本発明のモノクローナル抗体断片を得ることができる。
【００９２】
一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を、不死化ヒトＢ細胞から生成する。一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれるＰＣＴ／ＵＳ２００８／０７２１２４または米国特許出願第１２／６７１，９３６号において示されている方法などの方法を用いて生成する。
【００９３】
一実施形態では、本発明による抗体相同体を生成させるハイブリドーマ細胞（特定の抗体生成Ｂ細胞を骨髄腫と融合させることによる）から、抗ヌクレオリン抗体の免疫グロブリン軽鎖および免疫グロブリン重鎖をコードするｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡをクローニングすることにより、単離ヒト抗ヌクレオリン抗体のｃＤＮＡを生成することができる。一実施形態では、ヒトＢ細胞により、単離ヒト抗ヌクレオリン抗体を生成する。一実施形態では、ヒトＢ細胞から単離された、ヒトヌクレオリン抗体をコードする１または複数のポリヌクレオチド配列を、細胞にトランスフェクトする。軽鎖および重鎖両方の遺伝子が、それらに固有の、転写および翻訳のための発現制御配列に作動的に連結されるように、該ポリヌクレオチドをコードするｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡを発現ベクター内に挿入することができる。次いで、用いられる発現宿主細胞に適合するように、発現ベクターおよび発現制御配列を選択することができる。軽鎖および重鎖両方の遺伝子を、同じ発現ベクター内に挿入することが典型的である。
【００９４】
発現宿主としては、原核細胞を用いることもでき、真核細胞を用いることもできる。真核細胞は、原核細胞より、適正にフォールドされ、免疫学的に活性な抗体を構築および分泌する可能性が高いため、真核宿主細胞における発現が好ましい。しかし、不適正なフォールディングのために不活性とされている、生成された任意の抗体は、周知の方法により再天然化することができる（ＫｉｍおよびＢａｌｄｗｉｎ、１９８２年）。宿主細胞は、本発明による抗体相同体でもある、軽鎖二量体または重鎖二量体など、完全抗体の部分を生成させることが可能である。

【００９５】
上記の手順に対する変更は、本発明の範囲内にあることが理解される。一実施形態では、本発明の抗体相同体の軽鎖または重鎖（しかしこれらの両方ではない）をコードするＤＮＡにより、宿主細胞を形質転換する。また、組換えＤＮＡ法を用いて、ヌクレオリンの結合に必要でない、軽鎖および重鎖の一方または両方をコードするＤＮＡの一部または全部を除去することもできる。このような切断型ＤＮＡ分子から発現する分子が、本発明による抗体相同体である。一実施形態では、１つの重鎖および１つの軽鎖が、ヒト抗ヌクレオリン抗体の相同体であり、他の重鎖および軽鎖が、ヌクレオリン以外の抗原、またはヌクレオリンの別のエピトープに特異的である、二官能性抗体を生成する。

【００９６】
一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリン抗体をコードするＤＮＡを、「生産」規模または市販規模の量で発現させるのに好ましい哺乳動物細胞系に導入する。チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ細胞）が、組換えＤＮＡまたは非内因性ＤＮＡの優れた発現媒体となることは、以前から認知されている。米国特許第４，８１６，５６７号を参照されたい。米国特許第５，９８１，２１４号において示されている通り、特定のタンパク質をコードする挿入ＤＮＡまたはＤＮＡ配列の増幅を可能とする、一連のＤＨＦＲ欠損ＣＨＯ細胞株が開発されている。「生産」規模または市販規模の量で発現させるための、さらなる哺乳動物細胞系の例には、２９３ＨＥＫ細胞、ＨｅＬａ細胞、ＣＯＳ細胞、ＮＩＨ３Ｔ３細胞、Ｊｕｒｋａｔ細胞、ＮＳＯ細胞、およびＨＵＶＥＣ細胞が含まれるがこれらに限定されない。組換えタンパク質を発現させるのに適する他の哺乳動物細胞系は、文献において同定されており、本出願の発明において用いるのにも同等に適しうる。

【００９７】
Ａ．抗体のアミノ酸配列変異体
一実施形態では、本発明の抗ヌクレオリン抗体が、野生型と比較して修飾されたアミノ酸配列を含む。例えば、該抗体の結合アフィニティーおよび／または他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。抗ヌクレオリン抗体鎖をコードする核酸に適切なヌクレオチド変化を導入することにより、またはペプチド合成により、抗ヌクレオリン抗体のアミノ酸配列変異体を調製する。このような修飾には、例えば、抗ヌクレオリン抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、および／またはこれらへの挿入、および／またはこれらの置換が含まれる。最終的な構築物が、所望の特徴を保有すると仮定した上で、欠失、挿入、および置換の任意の組合せを施して、この最終構築物に到達する。アミノ酸変化はまた、グリコシル化部位の数または位置の変化など、抗ヌクレオリン抗体の翻訳後加工も変化させうる。

【００９８】
突然変異誘発に好ましい位置である、抗ヌクレオリン抗体のある残基または領域を同定するのに有用な方法は、ＣｕｎｎｉｎｇｈａｍおよびＷｅｌｌｓ　Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９８９年）により説明される通り、「アラニン走査突然変異誘発」と呼ばれる。この方法では、アミノ酸の抗原との相互作用に影響を及ぼす残基または標的残基群（例えば、ａｒｇ、ａｓｐ、ｈｉｓ、ｌｙｓ、およびｇｌｕなどの帯電残基）を同定し、中性アミノ酸または負帯電アミノ酸（アラニンまたはポリアラニンが最も好ましい）により置換する。次いで、置換部位において、または置換部位に代えて、さらなる変異体または他の変異体を導入することにより、置換に対する機能感受性を裏付けるアミノ酸位置を精選する。したがって、アミノ酸配列変異を導入する部位は予め定められているが、突然変異自体の性質は予め定める必要がない。例えば、所与の部位における突然変異の効能を解析するには、標的のコドンまたは領域においてａｌａ走査またはランダム突然変異誘発を施し、発現した抗ヌクレオリン抗体変異体を、所望の活性についてスクリーニングする。

【００９９】
アミノ酸配列の挿入には、長さが１残基～１００以上の残基を含有するポリペプチドの範囲にわたる、アミノ末端および／またはカルボキシル末端における融合のほか、単一または複数のアミノ酸残基の配列間挿入が含まれる。末端挿入体の例には、Ｎ末端において

メチオニル残基を伴う抗ヌクレオリン抗体、またはエピトープタグに融合させた該抗体が含まれる。抗ヌクレオリン抗体分子の他の挿入変異体には、該抗体のＮ末端またはＣ末端に、該抗体の血清半減期を延長する酵素またはポリペプチドを融合させる融合体が含まれる。

【０１００】

変異体の別の種類は、アミノ酸置換による変異体である。これらの変異体は、抗ヌクレオリン抗体分子内の少なくとも１つのアミノ酸残基が除去され、その場所に、異なる残基が挿入されている。（ａ）置換領域における、例えば、シート立体構造または螺旋立体構造としてのポリペプチド骨格の構造、（ｂ）標的部位における分子の電荷もしくは疎水性、または（ｃ）側鎖のバルクの維持に対するそれらの効果が著明に異なる置換を選択することにより、抗ヌクレオリン抗体の生物学的特性の実質的な修飾を達成する。天然の残基は、共通の側鎖特性に基づき群：（１）疎水性群：ノルロイシン、ｍｅｔ、ａｌａ、ｖａｌ、ｌｅｕ、ｉｌｅ；（２）中性の親水性群：ｃｙｓ、ｓｅｒ、ｔｈｒ；（３）酸性群：ａｓｐ、ｇｌｕ；（４）塩基性群：ａｓｎ、ｇｌｎ、ｈｉｓ、ｌｙｓ、ａｒｇ；（５）鎖の配向性に影響を及ぼす残基：ｇｌｙ、ｐｒｏ；および（６）芳香族群：ｔｒｐ、ｔｙｒ、ｐｈｅに分割される。

【０１０１】

また、非保存的置換も施すことができ、これらのクラスのうちの１つのメンバーを別のクラスのメンバーと交換することを伴う。また、該アンタゴニストの適正な立体構造を維持するのに関与していない任意のシステイン残基を、一般にはセリンで置換して、この分子の酸化に対する安定性を改善し、かつ、異常な架橋形成を防止することもできる。逆に、該アンタゴニストにシステイン結合（複数可）を付加して、その安定性（特に、抗ヌクレオリン抗体が、Ｆｖ断片などの抗体断片である場合）を改善することもできる。

【０１０２】

ある種の置換変異体は、親抗体（例えば、ヒト化抗体またはヒト抗体）の１または複数の超可変領域の残基を置換することを伴う。一般に、さらなる開発のために選択される、結果として得られる変異体（複数可）は、そこからそれらの変異体を生成させる親抗体と比べて生物学的特性が改善されている。このような置換変異体を生成させるのに簡便な方法は、ファージディスプレイを用いるアフィニティー成熟である。略述すると、複数の超可変領域部位（例えば、６～７カ所の部位）を突然変異させて、各部位において可能なすべてのアミノ酸置換を生成させる。このようにして生成させた抗体変異体を、Ｍ１３の繊維状ファージ粒子から、各粒子内に封入された遺伝子ＩＩＩ産物との融合体として、一価形態で提示させる。次いで、ファージにより提示された変異体を、本明細書で開示される、それらの生物学的活性（例えば、アンタゴニスト活性）についてスクリーニングする。修飾の候補となる超可変領域部位を同定するためには、アラニン走査突然変異誘発を実施して、抗原への結合に著明に寄与する超可変領域の残基を同定することができる。代替的に、または加えて、抗原－抗体複合体の結晶構造を解析して、抗体とヌクレオリンとの接触点を同定することも有益でありうる。本明細書で詳述される技法によれば、このような接触残基および近傍の残基が、置換の候補残基である。このような変異体を生成させたら、変異体のパネルを、本明細書で説明されるスクリーニングにかけ、１または複数の関与性のアッセイにおいて優れた特性を有する抗体を、さらなる開発のために選択することができる。

【０１０３】

Ｂ．抗体のグリコシル化変異体

一実施形態では、野生型抗体と比較してグリコシル化が改変されるように、抗ヌクレオリン抗体を修飾する。抗体は、それらの定常領域内の保存位置でグリコシル化している（ＪｅｆｆｅｒｉｓおよびＬｕｎｄ、１９９７年；ＷｒｉｇｈｔおよびＭｏｒｒｉｓｏｎ、１９９７年）。免疫グロブリンのオリゴ糖側鎖は、タンパク質の機能（Ｂｏｙｄら、１９９６年；ＷｉｔｔｗｅおよびＨｏｗａｒｄ、１９９０年）、ならびに糖タンパク質の立体構造ならびに提示される三次元表面に影響を及ぼしうる、糖タンパク質の部分間における

分子間相互作用（ＪｅｆｆｅｒｉｓおよびＬｕｎｄ、１９９６年）に影響を及ぼす。オリゴ糖はまた、特定の認識構造に基づき、ある分子を所与の糖タンパク質の標的とするのにも用いられる。例えば、非ガラクトシル化ＩｇＧでは、オリゴ糖部分が、ＣＨ２間スペースから「フリップ」アウトされ、末端のＮ－アセチルグルコサミン残基が、マンノース結合タンパク質に結合可能となる（Ｍａｌｈｏｔｒａら、１９９５年）。チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞内で生成されたＣＡＭＰＡＴＨ－１Ｈ（ヒトリンパ球のＣＤｗ５２抗原を認識する、組換えヒト化マウスモノクローナルＩｇＧ１抗体）から、グリコペプチダーゼによりオリゴ糖を除去すると、補体媒介性細胞溶解（ＣＭＣＬ）（Ｂｏｙｄら、１９９６年）が完全に低減される結果がもたらされたのに対し、ノイラミニダーゼを用いてシアル酸残基を選択的に除去しても、ＣＭＣＬが喪失される結果はもたらされなかった。抗体のグリコシル化はまた、抗体依存性細胞性細胞傷害作用（ＡＤＣＣ）にも影響することが報告されている。特に、バイセクティングＧｌｃＮＡｃの形成を触媒するグリコシルトランスフェラーゼである、β（１，４）－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩＩＩ（ＧｎＴＩＩＩ）を、テトラサイクリンの制御下で発現するＣＨＯ細胞は、ＡＤＣＣ活性が改善されていることが報告された（Ｕｍａｎａら、１９９９年）。

【０１０４】

抗体のグリコシル化は、Ｎ結合型またはＯ結合型であることが典型的である。Ｎ結合型グリコシル化とは、炭水化物部分が、アスパラギン残基の側鎖に結合することを指す。３連ペプチド配列であるアスパラギン－Ｘ－セリン、およびアスパラギン－Ｘ－トレオニン［式中、Ｘは、プロリン以外の任意のアミノ酸である］は、炭水化物部分がアスパラギン側鎖に酵素的に結合するための認識配列である。したがって、ポリペプチド中にこれらの３連ペプチド配列のうちのいずれかが存在すれば、潜在的なグリコシル化部位が創出される。Ｏ結合型グリコシル化とは、糖であるＮ－アセチルガラクトサミン（Ｎ－ａｓｅｙｌｇａｌａｃｔｏｓａｍｉｎｅ）、ガラクトース、またはキシロースのうちの１つが、最も一般的にはセリンまたはトレオニンであるが、５－ヒドロキシプロリンまたは５－ヒドロキシリシンもまた用いられうる、ヒドロキシアミノ酸に結合することを指す。

【０１０５】

抗体のグリコシル化変異体とは、抗体のグリコシル化のパターンが改変されている変異体である。改変とは、抗体において見出される１または複数の炭水化物部分を欠失させること、抗体に１または複数の炭水化物部分を付加すること、グリコシル化の組成（グリコシル化のパターン）、グリコシル化の程度を変化させることなどを意味する。

【０１０６】

それが上記で説明した３連ペプチド配列のうちの１または複数を含有する（Ｎ結合型グリコシル化部位の場合）ようにアミノ酸配列を改変することにより、抗体へのグリコシル化部位の付加を簡便に達成することができる。改変はまた、１または複数のセリン残基またはトレオニン残基を元の抗体配列に付加することによっても施すことができ、これらの残基で元の抗体を置換することによっても施すことができる（Ｏ結合型グリコシル化部位の場合）。同様に、抗体の天然のグリコシル化部位内のアミノ酸を改変することによって、グリコシル化部位を除去することもできる。

【０１０７】

通常は、その基底をなす核酸配列を改変することにより、アミノ酸配列を改変する。当技術分野において公知である各種の方法を介して、抗ヌクレオリン抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子を調製することができる。これらの方法には、天然の供給源からの単離（天然のアミノ酸配列変異体の場合）、または抗ヌクレオリン抗体の既に調製された変異体または非変異形に対する、オリゴヌクレオチド媒介（または部位指向）突然変異誘発、ＰＣＲによる突然変異誘発、およびカセットによる突然変異誘発を介する調製が含まれるがこれらに限定されない。

【０１０８】

また、そのアミノ酸配列またはその基底をなすヌクレオチド配列を改変せずに、抗体のグリコシル化（グリコシル化のパターンを含めた）を改変することもできる。グリコシル

化は、抗体を発現するのに用いられる宿主細胞に大きく依存する。潜在的な治療剤としての組換え糖タンパク質、例えば、抗体を発現するのに用いられる細胞型は、天然の細胞であることがまれなので、抗体のグリコシル化パターンには著明な変化が生じていると予測することができる（Ｈｓｅら、１９９７年）。宿主細胞の選択に加え、組換えにより抗体を生成するときにグリコシル化に影響を及ぼす因子には、増殖方式、培地の調合、培養物の密度、酸素化、ｐＨ、精製のスキームなどが含まれる。オリゴ糖の生成に関与するある酵素を導入するかまたは過剰発現することを含め、特定の宿主生物において達成されているグリコシル化のパターンを改変するための各種の方法が提起されている（米国特許第５，０４７，３３５号；同第５，５１０，２６１号；および同第５，２７８，２９９号）。グリコシル化、またはある種のグリコシル化は、例えば、エンドグリコシダーゼＨ（Ｅｎｄｏ　Ｈ）を用いて、糖タンパク質から酵素により除去することができる。加えて、組換え宿主細胞を遺伝子操作して、例えば、ある種の多糖のプロセシングを不完全にすることができる。これらの類似の技術は当技術分野において周知である。

【０１０９】

抗体のグリコシル化構造は、レクチンクロマトグラフィー、ＮＭＲ、質量分析、ＨＰＬＣ、ＧＰＣ、単糖組成解析、逐次酵素消化、および高ｐＨのアニオン交換クロマトグラフィーを用いて電荷に基づきオリゴ糖を分離するＨＰＡＥＣ－ＰＡＤを含めた、従来の炭水化物解析法により容易に解析することができる。また、解析を目的としてオリゴ糖を放出させる方法も公知であり、限定なしに述べればこれらには、酵素による処理（一般に、ペプチド－Ｎ－グリコシダーゼＦ／エンド－β－ガラクトシダーゼを用いて実施される）、強アルカリ性環境を用いて主にＯ結合型構造を放出させる除去、ならびに無水ヒドラジンを用いてＮ結合型オリゴ糖およびＯ結合型オリゴ糖の両方を放出させる化学的方法が含まれる。

【０１１０】

Ｃ．他の抗体修飾

一実施形態では、抗ヌクレオリン抗体を、イムノリポソームとして調合する。抗体を含有するリポソームは、Ｅｐｓｔｅｉｎら（１９８５年）；Ｈｗａｎｇら（１９８０年）；および米国特許第４，４８５，０４５号および同第４，５４４，５４５号において説明されている方法など、当技術分野において公知の方法により調製することができる。循環時間が改善されているリポソームは、米国特許第５，０１３，５５６号において開示されている。

【０１１１】

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびＰＥＧ誘導体化ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）を含む脂質組成物による逆相蒸発法を介して生成させることができる。小孔サイズが定められたフィルターを介してリポソームを射出成型し、所望の直径を有するリポソームを得る。Ｍａｒｔｉｎら（１９８２年）において説明されている通り、ジスルフィド交換反応を介して、本発明の抗体のＦａｂ’断片を、リポソームにコンジュゲートすることができる。場合によって、化学療法剤（ドキソルビシンなど）を、リポソーム内に含有させることができる。Ｇａｂｉｚｏｎら（１９８９年）を参照されたい。

【０１１２】

一実施形態では、プロドラッグ（例えば、ペプチジルによる化学療法剤；ＷＯ８１／０１１４５を参照されたい）を活性薬物へと転換するプロドラッグ活性化酵素へとコンジュゲートすることにより、抗ヌクレオリン抗体をＡＤＥＰＴ（抗体誘導型酵素プロドラッグ療法）において用いる。例えば、ＷＯ８８／０７３７８および米国特許第４，９７５，２７８号を参照されたい。

【０１１３】

ＡＤＥＰＴに有用なイムノコンジュゲートの酵素成分は、プロドラッグを、所望の生物学的特性を呈示する、そのより活性な形態へと転換するような形で、該プロドラッグに対して作用することが可能な任意の酵素を含有する。

【０１１４】
本発明の方法において有用な酵素には、リン酸を含有するプロドラッグを遊離薬物へと転換するのに有用なアルカリホスファターゼ；硫酸を含有するプロドラッグを遊離薬物へと転換するのに有用なアリールスルファターゼ；非毒性５－フルオロシトシンを抗癌薬である５－フルオロウラシルへと転換するのに有用なシトシンデアミナーゼ；ペプチドを含有するプロドラッグを遊離薬物へと転換するのに有用な、セラチアプロテアーゼ、テルモリシン、スブチリシン、カルボキシペプチダーゼ、およびカテプシン（カテプシンＢおよびカテプシンＬなど）などのプロテアーゼ；Ｄ－アミノ酸置換体を含有するプロドラッグを転換するのに有用なＤ－アラニルカルボキシペプチダーゼ；グリコシル化されたプロドラッグを遊離薬物へと転換するのに有用な、β－ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼなどの炭水化物切断酵素；β－ラクタムにより誘導体化された薬物を遊離薬物へと転換するのに有用なβ－ラクタマーゼ；ならびにそれらのアミン窒素において、それぞれ、フェノキシアセチル基またはフェニルアセチル基により誘導体化された薬物を遊離薬物へと転換するのに有用な、ペニシリンＶアミダーゼまたはペニシリンＧアミダーゼなどのペニシリンアミダーゼが含まれるがこれらに限定されない。代替的に、当技術分野ではまた、「アブザイム」としても公知である、酵素活性を有する抗体を用いて、本発明のプロドラッグを、遊離活性薬物へと転換することもできる（例えば、Ｍａｓｓｅｙ、１９８７年を参照されたい）。本明細書で説明される通りに抗体－アブザイムコンジュゲートを調製して、アブザイムを所望の細胞集団へと送達することができる。

【０１１５】
上記で論じたヘテロ二官能性架橋形成試薬の使用など、当技術分野において周知の技法を介して、酵素を抗ヌクレオリン抗体へと共有結合させることができる。代替的に、当技術分野において周知である組換えＤＮＡ法を用いて、本発明の酵素のうちの少なくとも機能的に活性な部分へと連結された、本発明の抗体のうちの少なくとも抗原結合領域を含む融合タンパク質を構築することもできる（例えば、Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら、１９８４年を参照されたい）。

【０１１６】
本発明の一実施形態では、抗ヌクレオリン抗体が、完全抗体ではなく、抗体断片を含む。この場合は、その血清半減期を延長するために、該抗体断片を修飾することができる。これは、例えば、サルベージ受容体結合エピトープを、抗体断片内に組み込むことにより（例えば、抗体断片内の適切な領域を突然変異させることにより、またはエピトープをペプチドタグへと組み込み、次いで、これを、例えば、ＤＮＡ合成またはペプチド合成により、抗体断片のいずれかの端部または中央部へと融合させることにより）達成することができる。１９９６年１０月１７日に公開されたＷＯ９６／３２４７８を参照されたい。

【０１１７】
サルベージ受容体結合エピトープは一般に、Ｆｃドメインのうちの１つまたは２つのループに由来する任意の１または複数のアミノ酸残基を、抗体断片の類似の位置へと導入する領域を構成する。Ｆｃドメインの１つまたは２つのループに由来する３つ以上の残基を導入することがなおより好ましい。Ｆｃ領域のうちのＣＨ２ドメイン（例えば、ＩｇＧの）からエピトープを取り出して、抗体のＣＨ１領域、ＣＨ３領域、もしくは$Ｖ_{Ｈ}$領域、または複数のこのような領域へと導入することがなおより好ましい。代替的には、Ｆｃ領域のＣＨ２ドメインからエピトープを取り出して、抗体断片の$Ｃ_{Ｌ}$領域もしくは$Ｖ_{Ｌ}$領域、またはこれらの両方へと導入する。

【０１１８】
一実施形態では、共有結合により、抗ヌクレオリン抗体を修飾する。共有結合には、抗体の化学合成を介する共有結合、または抗体の酵素的切断もしくは化学的切断を介する共有結合が含まれるがこれらに限定されない。標的とされる抗体のアミノ酸残基を、選択された側鎖またはＮ末端残基もしくはＣ末端残基と反応することが可能な有機誘導体化剤と反応させることにより、他の種類の共有結合による抗体の修飾を分子に導入する。例示的な、共有結合によるポリペプチドの修飾は、参照により本明細書に具体的に組み込まれる

、米国特許第５，５３４，６１５号において説明されている。共有結合による抗体の修飾の１つの種類は、米国特許第４，６４０，８３５号；同第４，４９６，６８９号；同第４，３０１，１４４号；同第４，６７０，４１７号；同第４，７９１，１９２号；または同第４，１７９，３３７号において示される形で、抗体を、各種の非タンパク質性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレンのうちの１つへと連結するステップを含む。

【０１１９】

別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体（ヒト抗体など）を、別の異種ポリペプチド配列または異種アミノ酸配列へと融合させるかまたはコンジュゲートすることにより、これを修飾する。

【０１２０】

一実施形態では、腫瘍または病原体に対して有効な自然免疫反応および後天免疫反応の生成を可能とする標的化イムノコンジュゲート部分を含むように、ヒト抗ヌクレオリン抗体を修飾する。一実施形態では、腫瘍または病原体に対して有効な自然免疫反応および後天免疫反応の生成を可能とする標的化イムノコンジュゲート部分を含むように、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を修飾する。一実施形態では、腫瘍または病原体に対して有効な自然免疫反応および後天免疫反応の生成を可能とする標的化イムノコンジュゲート部分を含むように、ヒトＢ細胞により生成された単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を修飾する。イムノコンジュゲートは、標的とされる腫瘍または病原体に対して有効な抗体媒介性免疫反応および／または細胞媒介性免疫反応をもたらすための複数の鍵となる要件：（ｉ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）／樹状細胞（ＤＣ）による腫瘍抗原（複数可）もしくは腫瘍抗原決定基（複数可）、または病原体抗原（複数可）もしくは病原体抗原決定基（複数可）の取込みおよび交差提示を誘導または増進すること；（ｉｉ）標的細胞環境において、樹状細胞（ＤＣ）の成熟を促進すること；（ｉｉｉ）ＣＤ４＋ヘルパーＴ細胞をもたらして、腫瘍または病原体に対するＣＤ８＋メモリーＴ細胞ならびに抗体を生成すること；（ｉｖ）標的とされる腫瘍細胞を、抗体依存性細胞性細胞傷害作用（ＡＤＣＣ）およびＴ細胞媒介性死滅へと感作することが含まれるがこれらに限定されない要件を同時に満たすことが可能でありうる。このようなイムノコンジュゲート抗体は、新生物性疾患、感染性疾患、ならびに他の障害に対する、標的化免疫療法または標的化免疫予防法に用いることができる。例えば、Ｔｏｌｌ様受容体などのパターン認識受容体（ＰＲＲ）は、多様な感染性微生物（細菌、真菌、原虫、ウイルス）が発現する病原体関連分子パターン（ＰＡＭＰ）、ならびに損傷した宿主組織が放出する分子（損傷関連分子パターン／アラルミン）を認識する。ＰＡＭＰを、単離ヒト抗ヌクレオリン抗体にコンジュゲートして添加することにより、ＰＲＲにより認識される核酸またはタンパク質を含む部分がもたらされ、最終的には、それに抗ヌクレオリン抗体が結合した標的細胞を消失させる免疫反応がもたらされる。抗ヌクレオリン抗体にコンジュゲートされうるＰＡＭＰの例には、ポリイノシン－ポリシチジル酸、リポ多糖（ＬＰＳ）、脂質Ａ、フラジェリン、ＧＵに富む短鎖一本鎖ＲＮＡ、非メチル化ＣｐＧ－オリゴデオキシヌクレオチドなど、公知のウイルス性エピトープおよび病原性エピトープが含まれるがこれらに限定されない。

【０１２１】

一実施形態では、抗ヌクレオリン抗体（ヒト抗体など）を、抗タグ抗体が選択的に結合するエピトープをもたらすタグポリペプチドと融合させるかまたはこれとコンジュゲートする。エピトープタグは、抗ヌクレオリン抗体のアミノ末端に配置することもでき、カルボキシル末端に配置することもできる。このようなエピトープタグ付けされた形態の抗ヌクレオリン抗体の存在は、該タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグを施すことにより、抗タグ抗体または該エピトープタグに結合する別の種類のアフィニティーマトリックスを用いるアフィニティー精製を介して、抗ヌクレオリン抗体を容易に精製することが可能となる。当技術分野では、各種のタグポリペプチドならびにそれらの各々の抗体が周知である。本発明の抗ヌクレオリン抗体に融合させうるエピトープタグの非限定的な例を、表３に列挙する。例には、ポリヒスチジン（ｐ

ｏｌｙ－ｈｉｓ）タグ、またはポリヒスチジン－グリシン（ｐｏｌｙ－ｈｉｓ－ｇｌｙ）タグ；インフルエンザウイルス血球凝集素（ｆｌｕ　ＨＡ）タグ、ならびにその抗体である１２ＣＡ５（Ｆｉｅｌｄら、１９８８年）；ｃ－ｍｙｃタグ、ならびにそれに対する８Ｆ９抗体、３Ｃ７抗体、６Ｅ１０抗体、Ｇ４抗体、Ｂ７抗体、および９Ｅ１０抗体（Ｅｖａｎら、１９８５年）；ならびに単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）によるタグ、ならびにその抗体（Ｐａｂｏｒｓｋｙら、１９９０年）が含まれる。他のタグポリペプチドには、Ｆｌａｇペプチド（Ｈｏｐｐら、１９８８年）；ＫＴ３エピトープペプチド（Ｍａｒｔｉｎら、１９９２年）；α－チューブリンエピトープペプチド（Ｓｋｉｎｎｅｒら、１９９１年）；ならびにＴ７遺伝子１０タンパク質によるペプチドタグ（Ｌｕｔｚ－Ｆｒｅｙｅｒｍｕｔｈら、１９９０年）が含まれる。

【０１２２】

【表３】

表 3:アフィニティータグの配列

| 配列番号 | タグ: | アミノ酸配列: |
|---|---|---|
| 5 | Poly-Arg | RRRRR　(配列番号 5) |
| 6 | Poly-Lys | KKKK　(配列番号 6) |
| 7 | Poly-His | HHHHHH (配列番号 7) |
| 8 | FLAG | DYKDDDDK (配列番号 8) |
| 9 | Strep タグ II | WSHPQFEK (配列番号 9) |
| 10 | c-myc | EQKLISEEDL (配列番号 10) |
| 11 | S | KETAAAKFERQHMDS (配列番号 11) |
| 12 | HAT | KDHLIHNVHKEFHAHAHNK (配列番号 12) |
| 13 | 3x FLAG | DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK (配列番号 13) |
| 14 | カルモジュリン結合ペプチド | KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL (配列番号 14) |
| 15 | SBP | MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP (配列番号 15) |
| 16 | キチン結合ドメイン | TNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ (配列番号 16) |
| 17 | グルタチオン S-トランスフェラーゼ | タンパク質 |
| 18 | マルトース結合タンパク質 | タンパク質 |

一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を、ナノ粒子に連結する。一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を、ナノ粒子に連結する。一実施形態では、ヒトＢ細胞により生成させたヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を、ナノ粒子に連結する。細胞表面のヌクレオリンは、ＰＥＧ化ポリリシンとＤＮＡとからなるＤＮＡナノ粒子に対する受容体として用いられることが報告されている（Ｃｈｅｎら、２００８年）。一実施形態では、抗体－ナノ粒子コンジュゲートが、非コンジュゲート抗体より迅速かつ広範に、その表面においてヌクレオリンを発現する細胞に侵入しうる。一実施形態では、細胞が、癌細胞、腫瘍細胞、ウイルス感染細胞、リンパ球、または活性化リンパ球である。

【０１２３】

Ｄ．細胞系の寄託

１または複数のヌクレオリン（ＮＣＬ）ポリペプチド（例えば、配列番号４またはその断片）に免疫特異的に結合する抗体を発現する細胞系は、２０１０年１１月１７日、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（１０８０１、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｂｏｕｌｅｖａｒｄ、Ｍａｎａｓｓａｓ、Ｖａ．２０１１０－２２０９

、Ｕ．Ｓ．Ａ．）に原寄託物として寄託され、受託番号ＡＴＣＣ＿＿、ＡＴＣＣ＿＿、ＡＴＣＣ＿＿、ＡＴＣＣ＿＿、ＡＴＣＣ＿＿、ＡＴＣＣ＿＿、およびＡＴＣＣ＿＿を与えられた。該寄託は、ブダペスト条約下でなされたものであり、本特許が交付されれば、３７Ｃ．Ｆ．Ｒ．１．８０８（ｂ）において明記される要件を除き、寄託物質の一般公開可能性に対するすべての制約は取消不能な形で取り除かれるものとし、寄託の期限は３７Ｃ．Ｆ．Ｒ．１．８０６に準拠するものとする。

【０１２４】

Ｖ．診断剤

一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、ヒトにおける癌細胞の存在を決定する。一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、ヒトにおける癌細胞の存在を決定する。一実施形態では、ヒトＢ細胞により生成された単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、ヒトにおける癌細胞の存在を決定する。

【０１２５】

一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、ヒト試料における癌細胞の存在を決定する。一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、ヒト試料における癌細胞の存在を決定する。一実施形態では、ヒトＢ細胞により発現された単離抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を提供し、これを用いてヒト試料における癌細胞の存在を決定する。用いられる、ヒト試料という用語は、細胞、組織、血漿、血清、全血液、痰、または唾液が含まれるがこれらに限定されない、被験体に由来する生物学的回収物を指す。一実施形態では、ヒト被験体試料に由来する検出結果を、対照試料に由来する検出結果と比較する。一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、被験体における癌細胞の存在を決定する。一実施形態では、ヒトＢ細胞により発現された単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、被験体における癌細胞の存在を決定する。一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を、ヒト癌細胞表面におけるヌクレオリンに結合させることにより決定を行う。「癌」および「癌性」という用語は、無制御の細胞増殖を特徴とすることが典型的な、哺乳動物における生理学的状態を指すかまたはこれについて述べる。癌の例には、急性リンパ芽球性白血病；骨髄性白血病；急性骨髄性白血病；慢性骨髄性白血病；副腎皮質癌；ＡＩＤＳ関連癌；ＡＩＤＳ関連リンパ腫；肛門癌；小児小脳星状細胞腫；小児大脳星状細胞腫；基底細胞癌；肝外胆管癌；膀胱癌；骨肉腫／悪性線維性組織球腫性骨癌；脳幹神経膠細胞腫；脳腫瘍；脳幹神経膠腫性脳腫瘍；小脳星状細胞腫性脳腫瘍；大脳星状細胞腫／悪性神経膠腫性脳腫瘍；脳室上皮腫性脳腫瘍；髄芽腫性脳腫瘍；テント上原始神経外胚葉腫瘍性脳腫瘍；視経路視床下部神経膠腫性脳腫瘍；女性乳癌；男性乳癌；気管支腺癌／気管支カルチノイド；バーキットリンパ腫；カルチノイド腫瘍；中枢神経系リンパ腫；小脳星状細胞腫；大脳星状細胞腫／悪性神経膠腫；子宮頚癌；慢性リンパ球性白血病；慢性骨髄性白血病；慢性骨髄増殖性障害；結腸癌；結腸直腸癌；皮膚Ｔ細胞リンパ腫；Ｂ細胞リンパ腫；子宮内膜癌；脳室上皮腫；食道癌；ユーイング肉腫族の腫瘍；頭蓋外胚細胞腫瘍；肝外胆管癌；眼内黒色腫性眼癌；網膜芽腫性眼癌；胆嚢癌；胃（Ｇａｓｔｒｉｃ（Ｓｔｏｍａｃｈ））癌；消化管カルチノイド癌；頭蓋外胚細胞腫瘍；卵巣胚細胞腫瘍；妊娠性絨毛腫瘍；神経膠腫；小児脳幹神経膠腫；小児大脳星状細胞腫性神経膠腫；小児視経路視床下部神経膠腫；毛様細胞白血病；頭頚部癌；成人（原発性）肝細胞（肝）癌；小児（原発性）肝細胞（肝）癌；ホジキンリンパ腫；妊娠期ホジキンリンパ腫；下咽頭癌；視床下部視経路神経膠腫；眼内黒色腫；膵島細胞癌（膵臓内分泌部癌）；カポジ肉腫；腎（腎細胞）癌；腎癌；喉頭癌；急性リンパ芽球性白血病；急性骨髄性白血病；慢性リンパ球性白血病；慢性骨髄性白血病；口唇口腔癌；成人（原発性）肝癌；小児（原発性）肝癌；非小細胞肺癌；ＡＩＤＳ関連リンパ腫；バーキットリンパ腫；皮膚Ｔ細胞リンパ腫（菌状息肉腫およびセザリー症候群を参照されたい）；ホジキンリンパ腫；妊娠期ホジキンリンパ腫；非ホジキンリンパ腫；妊娠期非ホジキンリンパ腫；原発性中枢神経系リンパ腫；ワルデンシュトレームマクログロブリン血症；悪性線維性骨組織球腫／骨肉腫；髄芽腫；黒色腫；眼内（眼）黒色腫；メルケル細胞癌；成人悪性中皮腫；中皮腫；潜在性原発腫瘍を伴う転移性扁平細胞性頸部癌；多発性内分泌腫瘍

症候群；多発性黒色腫／形質細胞腫瘍；菌状息肉腫；骨髄異形成症候群；骨髄異形成／骨髄増殖性疾患；慢性骨髄性白血病；成人急性骨髄性白血病；小児急性骨髄性白血病；多発性硬化症；慢性骨髄増殖性障害；鼻腔副鼻腔癌；鼻咽頭癌；神経芽腫；非ホジキンリンパ腫、妊娠期非ホジキンリンパ腫；口腔癌；口唇口腔癌；口腔咽頭癌；骨肉腫／悪性線維性骨組織球腫；卵巣癌；卵巣上皮癌；卵巣胚細胞腫瘍；卵巣低悪性度潜在性腫瘍；膵臓癌；膵島細胞性膵臓癌；副甲状腺癌；陰茎癌；褐色細胞腫；松果体芽腫およびテント上原始神経外胚葉腫瘍；下垂体腫瘍；形質細胞腫／多発性黒色腫；胸膜肺芽腫；妊娠期乳癌；妊娠期ホジキンリンパ腫；妊娠期非ホジキンリンパ腫；原発性中枢神経系リンパ腫；前立腺癌；直腸癌；腎細胞（腎）癌；腎盂尿管移行上皮細胞癌；網膜芽腫；横紋筋肉腫；唾液腺癌；ユーイング肉腫族の腫瘍；カポジ肉腫；軟組織肉腫；子宮肉腫；セザリー症候群；皮膚癌（非黒色腫性皮膚癌）；皮膚癌；皮膚癌（黒色腫）；メルケル細胞性皮膚癌；小細胞肺癌；小腸癌；軟組織肉腫；扁平細胞癌（皮膚癌（非黒色腫性皮膚癌）を参照されたい）；潜在性原発腫瘍を伴う転移性扁平細胞性頸部癌；胃（Ｇａｓｔｒｉｃ（Ｓｔｏｍａｃｈ））癌；テント上原子神経外胚葉腫瘍；皮膚Ｔ細胞リンパ腫（菌状息肉腫およびセザリー症候群を参照されたい）；精巣癌；胸腺腫；胸腺腫および胸腺癌；甲状腺癌；腎盂尿管移行上皮細胞癌；妊娠性絨毛腫瘍；尿管腎盂移行上皮細胞癌；尿路癌；子宮内膜癌；子宮肉腫；膣癌；視経路視床下部神経膠腫；外陰癌；ワルデンシュトレームマクログロブリン血症；およびウィルムス腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。

【０１２６】

一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、増殖性障害の存在を決定する。一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、増殖性障害の存在を決定する。一実施形態では、ヒトＢ細胞から生成させたヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、増殖性障害の存在を決定する。本明細書で用いられる「細胞増殖性障害」、「増殖性障害」、および「新生物性障害」とは、ある程度の異常な細胞増殖に随伴する障害を指す。

【０１２７】

一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、ヌクレオリンが細胞表面または細胞質に発現される悪性疾患の存在を決定する。一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、ヌクレオリンが細胞表面または細胞質に発現される悪性疾患の存在を決定する。一実施形態では、ヒトＢ細胞により発現された単離抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を提供し、これを用いてヌクレオリンが細胞表面または細胞質に発現される悪性疾患の存在を決定する。本明細書で用いられる「悪性疾患」という用語は、増悪性疾患もしくは転移性疾患、または微小残存病変など、少量の腫瘍負荷を特徴とする疾患を指す。ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いてその存在を決定する悪性疾患の例には、白血病（例えば、急性骨髄性白血病、急性リンパ球性白血病、および慢性骨髄性白血病）および癌（例えば、乳癌、肺癌、甲状腺癌、もしくは消化器癌、または黒色腫）が含まれるがこれらに限定されない。

【０１２８】

一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、ヌクレオリンが細胞表面または細胞質に発現される非悪性細胞増殖性障害の存在を決定する。一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、ヌクレオリンが細胞表面または細胞質に発現される非悪性細胞増殖性障害の存在を決定する。一実施形態では、ヒトＢ細胞により発現された単離抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を提供し、これを用いてヌクレオリンが細胞表面または細胞質に発現される非悪性細胞増殖性障害の存在を決定する。例えば、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いてその存在を決定しうる非悪性細胞増殖性障害の非限定的な具体例には、疣、良性前立腺過形成、スキンタグ、および非悪性腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。例えば、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、良性前立腺過形成または望ましくない生殖器疣を特徴づける望ましくない細胞を除去の標的とすることにより、このような状態などの細胞増殖性障害を決定することができる。一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、ヌクレ

オリンをその表面またはその細胞質に発現する血管新生性腫瘍細胞の存在を決定する。
【０１２９】
一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、腫瘍の存在を決定する。本明細書で用いられる「腫瘍」とは、悪性であれ良性であれ、すべての新生物性細胞の増殖（ｇｒｏｗｔｈおよびｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ）、ならびにすべての前癌性細胞および前癌性組織ならびに癌性細胞および癌性組織を指す。
【０１３０】
一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、ヒトヌクレオリンをその表面またはその細胞質に発現する細胞の存在を、自己免疫疾患を有する被験体において決定する。一実施形態では単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、ヒトヌクレオリンをその表面またはその細胞質に発現する細胞の存在を、自己免疫疾患を有する被験体において決定する。一実施形態では、ヒトＢ細胞により発現された単離抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を提供し、これを用いてヒトヌクレオリンをその表面またはその細胞質に発現する細胞の存在を、自己免疫疾患を有する被験体において決定する。一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、ヒトヌクレオリンをその表面またはその細胞質に発現する細胞がリンパ球中に存在することを決定する。一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、ヒトヌクレオリンをその表面またはその細胞質に発現する細胞がリンパ球中に存在することを決定する。一実施形態では、ヒトＢ細胞により発現された単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を提供し、これを用いてヒトヌクレオリンをその表面またはその細胞質に発現する細胞がリンパ球中に存在することを決定する。一実施形態では、リンパ球が、Ｂ細胞、Ｔ細胞、またはナチュラルキラー細胞を含む。一実施形態では、リンパ球が、ＣＤ４陽性細胞またはＣＤ８陽性細胞を含む。
【０１３１】
一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、ヒトヌクレオリンをその表面またはその細胞質に発現する細胞が活性化リンパ球中またはメモリー細胞中に存在することを決定する。一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、ヒトヌクレオリンをその表面またはその細胞質に発現する細胞が活性化リンパ球中またはメモリー細胞中に存在することを決定する。一実施形態では、ヒトＢ細胞により発現された単離抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を提供し、これを用いてヒトヌクレオリンをその表面またはその細胞質に発現する細胞が活性化リンパ球中またはメモリー細胞中に存在することを決定する。一実施形態では、活性化リンパ球が、Ｂ細胞、Ｔ細胞、またはナチュラルキラー細胞を含む。
【０１３２】
「自己免疫疾患または自己免疫障害」という用語は、それ自身の細胞、組織、および／または器官に対する被験体の免疫反応により引き起こされる細胞傷害、組織傷害、および／または器官傷害を特徴とする、被験体における状態を指す。「炎症性疾患」という用語は、炎症、好ましくは慢性炎症を特徴とする、被験体における状態を指すのに、「炎症性障害」という用語と互換的に用いられる。自己免疫障害は、炎症を随伴させる場合もあり、炎症を随伴させない場合もある。さらに、炎症は、自己免疫障害により引き起こされる場合もあり、自己免疫障害により引き起こされない場合もある。したがって、ある障害は、自己免疫障害および炎症性障害のいずれとしても特徴づけられる場合がある。ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いることにより診断されうる例示的な自己免疫疾患または自己免疫障害には、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、喘息、自己免疫性副腎疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎および自己免疫性抗癌炎、自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスプルー－皮膚炎、慢性疲労性免疫不全症候群（ＣＦＩＤＳ）、慢性炎症性脱髄性多発性神経障害、チャーグ－ストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡、ＣＲＥＳＴ症候群、寒冷凝集素症、クローン病、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、疱疹状皮膚炎、糖尿病（例えば、１型）、糖尿病性網膜症、好酸球性筋膜炎、線維筋痛症－線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン－バレー症候群、橋本甲状腺炎、ヘノッ

ホーシェーンライン紫斑病、特発性肺線維症、特発性／自己免疫性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、ＩｇＡ性神経障害、若年性関節炎、扁平苔癬、エリテマトーデス、メニエール病、混合型結合組織病、多発性硬化症、１型糖尿病または免疫媒介性糖尿病、重症筋無力症、天疱瘡関連障害（例えば、尋常性天疱瘡）、骨髄異形成症候群、悪性貧血、結節性動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性自己免疫性症候群、リウマチ性多発性筋痛、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティッフマン症候群、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、スイート症候群、スティル病、エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭部動脈炎／巨細胞動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、血管炎、尋常性白斑、およびウェゲナー肉芽腫症である。炎症性障害の例には、喘息、脳炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、アレルギー性障害、敗血症性ショック、肺線維症、未分化型脊椎関節症、未分化型関節症、関節炎、炎症性骨溶解、移植片対宿主病、蕁麻疹、またはフォークト－小柳－原田症候群、慢性炎症性肺炎、ならびに慢性ウイルス感染または慢性細菌感染から生じる慢性炎症が含まれるがこれらに限定されない。

【０１３３】

一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、ヒトヌクレオリンをその表面またはその細胞質に発現する細胞がウイルス感染細胞中に存在することを決定する。一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、ヒトヌクレオリンをその表面またはその細胞質に発現する細胞がウイルス感染細胞中に存在することを決定する。一実施形態では、ヒトＢ細胞により発現された単離抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を提供し、これを用いて、ヒトヌクレオリンをその表面またはその細胞質に発現する細胞がウイルス感染細胞中に存在することを決定する。ヌクレオリンは、ウイルス感染細胞の細胞表面で発現する（Ｈｏｖａｎｅｓｓｉａｎら、２００６年；Ｂｏｓｅら、２００４年；Ｉｚｕｍｉら、２００１年）。細胞に感染しうるウイルスの例には、Ｒｅｔｒｏｖｉｒｉｄａｅ科（例えば、ＨＩＶ－１ウイルス（また、ＨＴＬＶ－ＩＩＩウイルス、ＬＡＶウイルス、もしくはＨＴＬＶ－ＩＩＩ／ＬＡＶウイルス、またはＨＩＶ－ＩＩＩウイルスとしても言及される）；ならびにＨＩＶ－ＬＰウイルスなどの他の単離ウイルスなど、ヒト免疫不全ウイルス）；Ｐｉｃｏｒｎａｖｉｒｉｄａｅ科（例えば、ポリオウイルス、Ａ型肝炎ウイルス；エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス）；Ｃａｌｃｉｖｉｒｉｄａｅ科（例えば、胃腸炎を引き起こすウイルス株）；Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅ科（例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス）；Ｆｌａｖｉｒｉｄａｅ科（例えば、デング熱ウイルス、脳炎ウイルス、黄熱ウイルス）；Ｃｏｒｏｎａｖｉｒｉｄａｅ（Ｃｏｒｏｎｏｖｉｒｉｄａｅ）科（例えば、コロナウイルス）；Ｒｈａｂｄｏｖｉｒａｄａｅ（例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）；Ｆｉｌｏｖｉｒｉｄａｅ科（例えば、エボラウイルス）；Ｐａｒａｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅ科（例えば、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、ＲＳ（ｒｅｓｐｉｒａｔｏｒｙ ｓｙｎｃｙｔｉａｌ）ウイルス）；Ｏｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅ科（例えば、インフルエンザウイルス）；Ｂｕｎｇａｖｉｒｉｄａｅ科（例えば、ハンターンウイルス、ブンガウイルス、フレボウイルス、およびナイロウイルス）；Ａｒｅｎａｖｉｒｉｄａｅ（Ａｒｅｎａ ｖｉｒｉｄａｅ）科（出血性発熱ウイルス）；Ｒｅｏｖｉｒｉｄａｅ科（例えば、レオウイルス、オルビウイルス、およびロタウイルス）；Ｂｉｍａｖｉｒｉｄａｅ科；Ｈｅｐａｄｎａｖｉｒｉｄａｅ科（Ｂ型肝炎ウイルス）；Ｐａｒｖｏｖｉｒｉｄａｅ（Ｐａｒｖｏｖｉｒｉｄａ）科（パルボウイルス）；Ｐａｐｏｖａｖｉｒｉｄａｅ科（パピローマウイルス、ポリオーマウイルス）；Ａｄｅｎｏｖｉｒｉｄａｅ科（大半のアデノウイルス）；Ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｉｄａｅ科（単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）１および２、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、ヘルペスウイルス）；ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）、トリ白血病ウイルス（ＡＬＶ）、およびトリ骨芽球症ウイルス（ＡＭＶ）；ならびにＣ型哺乳動物レトロウイルスＢ群（ネコ白血病ウイルス（ＦｅＬＶ）、テナガザル白血病ウイルス（ＧＡＬＶ）、脾臓壊死ウイルス（ＳＮ

Ｖ）、細膜内皮症ウイルス（ＲＶ）、およびサル肉腫ウイルス（ＳＳＶ））；マソン－ファイザーサルウイルス（ＭＰＭＶ）および１型サルレトロウイルス（ＳＲＶ－１）を含めたＤ型レトロウイルス；レンチウイルスのサブグループ、Ｔ細胞白血病ウイルス、および泡沫状ウイルスを含めたコンプレックスレトロウイルス；ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２、ＳＩＶ、ビスナウイルス、ネコ免疫不全ウイルス（ＦＩＶ）、およびウマ感染性貧血症ウイルス（ＥＩＡＶ）を含めたレンチウイルス；サルＴ細胞白血病ウイルス（ＳＴＬＶ）、およびウシ白血病ウイルス（ＢＬＶ）；ヒト泡沫状ウイルス（ＨＦＶ）、サル泡沫状ウイルス（ＳＦＶ）、およびウシ泡沫状ウイルス（ＢＦＶ）を含めた泡沫状ウイルス；Ｐｏｘｖｉｒｉｄａｅ（Ｐｏｘｙｉｒｉｄａｅ）科（痘瘡ウイルス、牛痘ウイルス、ポックスウイルス）；ならびにＩｒｉｄｏｖｉｒｉｄａｅ科（例えば、アフリカブタ熱ウイルス）；ならびに分類不明ウイルス（例えば、海綿状脳症の病原ウイルス、デルタ肝炎の病原ウイルス（Ｂ型肝炎ウイルスの欠陥サテライトウイルスであると考えられている）、非Ａ型、非Ｂ型肝炎の病原ウイルス（クラス１＝内部感染型ウイルス；クラス２＝非経口感染型ウイルス（すなわち、Ｃ型肝炎ウイルス））；ノーウォークウイルスならびに類縁のウイルス；ならびにアストロウイルスが含まれるがこれらに限定されない。細胞に感染しうる他の病原体の例には、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ属（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ、Ｍ. ｂｏｖｉｓ、Ｍ. ａｖｉｕｍ－ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒｅ、Ｍ. ｌｅｐｒａｅ）、Ｐｎｅｕｍｏｃｏｃｃｕｓ属、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ属、Ｓｔａｐｈｙｌｃｏｃｏｃｃｕｓ属、Ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａ属、Ｌｉｓｔｅｒｉａ属、Ｅｒｙｓｉｐｅｌｏｔｈｒｉｘ属、炭素菌、破傷風菌、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ属、混合型嫌気性細菌、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ属、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ属、Ｓｈｉｇｅｌｌａ属、Ｈｅｍｏｐｈｉｌｕｓ属、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ、Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ属、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ属、Ｓｅｒｒａｔｉａ属、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ属、Ｂｏｒｄａｔｅｌｌａ属、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ、Ｙｅｒｓｉｎｉａ属、Ｖｉｂｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａｅ、Ｂａｒｔｏｎｅｌｌａ属、Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ属、Ｓｐｉｒｏｃｈａｅｔｅｓ属（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ属、Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ属、Ｂｏｒｒｅｌｉａ属）、真菌、Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｓ属、Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ属、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ属、Ｃｈｌａｍｙｄｉａ属、原虫（Ｅｎｔａｍｏｅｂａ属、Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ属、Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ属、Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ属、Ｔｏｘｏｐｌａｓｍａ属、Ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ属、Ｂａｂａｓｉａ属、Ｇｉａｒｄｉａ属、Ｃｒｙｐｔｏｓｐｏｒｉｄｉｕｍ属、Ｔｒｉｃｈｏｍｏｎａｓ属を含めた）、蠕虫（Ｔｒｉｃｈｉｎｅｌｌａ属、Ｗｕｃｈｅｒａｒｉａ属、Ｏｎｃｈｏｃｅｒｃａ属、Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ属、線虫、条虫、吸虫）、ならびにウイルス性肺炎の病原ウイルスが含まれるがこれらに限定されない。米国特許公開第２００７／００６６５５４号において開示されている抗原など、本発明の組成物の標的となりうるさらなる抗原の例が公知である。別の実施形態では、コンジュゲートが、本明細書で説明される抗原または細胞の構成要素を含みうるが、これは、標的化部分ならびに免疫刺激性核酸分子に加えて含まれるものである。

【０１３４】

一実施形態では、抗ヌクレオリン抗体を用いる治療適用および／または診断適用において、検出可能な標識を用いる。「検出可能な標識」とは、結合した抗体の検出を可能とする化合物および／または元素である。当技術分野では、それらを抗体に結合させる方法と同様、多くの適切な造影剤が公知である（例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第５，０２１，２３６号；同第４，９３８，９４８号；および同第４，４７２，５０９号を参照されたい）。用いられる造影部分は、常磁性イオン；放射性同位元素；蛍光色素；ＮＭＲにより検出可能な物質；Ｘ線による造影剤でありうる。他の薬剤には、酵素、ハプテン、蛍光標識、リン光分子、化学発光分子、発色団、光親和性分子、有色粒子、またはビオチンなどのリガンドが含まれる。

【０１３５】

一態様では、検出可能な標識が、常磁性イオンを含む。常磁性イオンの例には、クロム（ＩＩＩ）、マンガン（ＩＩ）、鉄（ＩＩＩ）、鉄（ＩＩ）、コバルト（ＩＩ）、ニッケ

ル（ＩＩ）、銅（ＩＩ）、ネオジミウム（ＩＩＩ）、サマリウム（ＩＩＩ）、イッテルビウム（ＩＩＩ）、ガドリニウム（ＩＩＩ）、バナジウム（ＩＩ）、テルビウム（ＩＩＩ）、ジスプロシウム（ＩＩＩ）、ホルミウム（ＩＩＩ）および／またはエルビウム（ＩＩＩ）、が含まれるがこれらに限定されず、ガドリニウムが特に好ましい。Ｘ線による造影など、他の文脈で有用なイオンには、ランタン（ＩＩＩ）、金（ＩＩＩ）、鉛（ＩＩ）、およびビスマス（ＩＩＩ）が含まれるがこれらに限定されない。一態様では、検出可能な標識が、放射性同位元素を含む。放射性同位元素の例には、$^{124}$アンチモン、$^{125}$アンチモン、$^{74}$ヒ素、$^{211}$アスタチン、$^{103}$バリウム、$^{140}$バリウム、$^{7}$ベリリウム、$^{206}$ビスマス、$^{207}$ビスマス、$^{109}$カドミウム、$^{115}$カドミウム、$^{45}$カルシウム、$^{14}$炭素、$^{139}$セリウム、$^{141}$セリウム、$^{144}$セリウム、$^{137}$セシウム、$^{51}$クロム、$^{36}$塩素、$^{56}$コバルト、$^{57}$コバルト、$^{58}$コバルト、$^{60}$コバルト、$^{67}$銅、$^{169}$エルビウム、$^{152}$ユーロピウム（$^{152}$ｅｕｒｐｉｕｍ）、$^{67}$ガリウム、$^{153}$ガドリニウム、$^{195}$金、$^{199}$金、$^{175}$ハフニウム、$^{175+181}$ハフニウム、$^{181}$ハフニウム、$^{3}$水素、$^{123}$ヨウ素、$^{125}$ヨウ素、$^{131}$ヨウ素、$^{111}$インジウム、$^{192}$イリジウム、$^{55}$鉄、$^{59}$鉄、$^{85}$クリプトン、$^{210}$鉛、$^{177}$ルテチウム、$^{54}$マンガン、$^{197}$水銀、$^{203}$水銀、$^{99}$モルビデン、$^{147}$ネオジミウム（$^{147}$ｎｅｏｄｙｎｉｕｍ）、$^{237}$ネプツニウム、$^{63}$ニッケル、$^{95}$ニオビウム、$^{185+191}$オスミウム、$^{103}$パラジウム、$^{32}$リン、$^{184}$白金、$^{143}$プラセオジミウム、$^{147}$プロメチウム、$^{233}$プロトアクチニウム、$^{226}$ラジウム、$^{186}$レニウム（ｒｈｅｎｉｕｍ$^{186}$）、$^{188}$レニウム、$^{86}$ルビジウム、$^{130}$ルテニウム、$^{106}$ルテニウム、$^{44}$スカンジウム、$^{46}$スカンジウム、$^{45}$セレニウム、$^{75}$セレニウム、$^{110m}$銀、$^{111}$銀、$^{22}$ナトリウム、$^{85}$ストロンチウム、$^{89}$ストロンチウム、$^{90}$ストロンチウム、$^{35}$硫黄、$^{182}$タンタル、$^{99m}$テクネチウム（$^{99m}$ｔｅｃｈｎｉｃｉｕｍ）、$^{125m}$テルリウム、$^{132}$テルリウム、$^{160}$テルビウム、$^{204}$タリウム、$^{228}$トリウム、$^{232}$トリウム、$^{170}$ツリウム（$^{170}$ｔｈｕｌｌｉｕｍ）、$^{113}$スズ、$^{44}$チタン、$^{185}$タングステン、$^{48}$バナジウム、$^{49}$バナジウム、$^{88}$イットリウム、$^{90}$イットリウム、$^{91}$イットリウム、$^{169}$イッテルビウム、$^{65}$亜鉛、および$^{95}$ジルコニウムが含まれるがこれらに限定されない。

【０１３６】

一実施形態では、それらが低エネルギーであり、長期間にわたる検出に適するために、$^{125}$ヨウ素、$^{99m}$テクネチウム（ｔｅｃｈｎｉｃｉｕｍ$^{99m}$）、および／または$^{111}$インジウム（ｉｎｄｉｕｍ$^{111}$）を用いる。当技術分野において周知の方法により、本発明の放射性標識モノクローナル抗体を生成することができる。例えば、ヨウ化ナトリウムおよび／またはヨウ化カリウムと、次亜塩素酸ナトリウムなどの化学的酸化剤またはラクトペルオキシダーゼなどの酵素的酸化剤とを接触させることにより、モノクローナル抗体をヨウ素化することができる。本発明によるモノクローナル抗体は、リガンド交換工程を介して、例えば、第一スズ溶液で過テクネチウム酸を還元し、該還元されたテクネチウムをＳｅｐｈａｄｅｘカラムへとキレート化し、かつ、抗体をこのカラムへと適用することにより、$^{99m}$テクネチウム（ｔｅｃｈｎｅｔｉｕｍ$^{99m}$）で標識することができる。代替的に、例えば、過テクネチウム酸、$SNCl_2$などの還元剤、フタル酸ナトリウム－カリウム溶液、ならびに抗体をインキュベートすることにより、直接的な標識化法を用いることもできる。金属イオンとして存在する放射性同位元素を抗体へと結合させるのに用いられることが多い中間官能基は、ジエチレントリアミンペンタ酢酸（ＤＴＰＡ）またはエチレンジアミンテトラ酢酸（ＥＤＴＡ）である。

【０１３７】

一実施形態では、検出可能な標識が、蛍光標識を含む。蛍光標識の例には、Ａｌｅｘａ３５０、Ａｌｅｘａ　４３０、ＡＭＣＡ、ＢＯＤＩＰＹ　６３０／６５０、ＢＯＤＩＰＹ　６５０／６６５、ＢＯＤＩＰＹ－ＦＬ、ＢＯＤＩＰＹ－Ｒ６Ｇ、ＢＯＤＩＰＹ－ＴＭＲ、ＢＯＤＩＰＹ－ＴＲＸ、Ｃａｓｃａｄｅ　Ｂｌｕｅ、Ｃｙ３、Ｃｙ５、６－ＦＡＭ、イソシアン酸フルオレセイン、ＨＥＸ、６－ＪＯＥ、Ｏｒｅｇｏｎ　Ｇｒｅｅｎ　４８８

、Ｏｒｅｇｏｎ Ｇｒｅｅｎ ５００、Ｏｒｅｇｏｎ Ｇｒｅｅｎ ５１４、Ｐａｃｉｆｉｃ Ｂｌｕｅ、ＲＥＧ、Ｒｈｏｄａｍｉｎｅ Ｇｒｅｅｎ、Ｒｈｏｄａｍｉｎｅ Ｒｅｄ、Ｒｅｎｏｇｒａｐｈｉｎ、ＲＯＸ、ＴＡＭＲＡ、ＴＥＴ、テトラメチルローダミン、および／またはＴｅｘａｓ Ｒｅｄが含まれるがこれらに限定されない。

【０１３８】

本発明で意図される別の種類の抗体コンジュゲートは、主にｉｎ ｖｉｔｒｏにおける使用が意図される抗体コンジュゲートであり、この場合は、抗体を、二次的結合リガンドならびに／または発色性基質と接触すると有色生成物を生成させる酵素（酵素タグ）に連結する。適切な酵素には、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、（西洋ワサビ）水素ペルオキシダーゼ、またはグルコースオキシダーゼが含まれるがこれらに限定されない。具体的な二次的結合リガンドは、ビオチンおよび／またはアビジン、ならびにストレプトアビジン化合物である。このような標識の使用は、当業者に周知であり、例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第３，８１７，８３７号；同第３，８５０，７５２号；同第３，９３９，３５０号；同第３，９９６，３４５号；同第４，２７７，４３７号；同第４，２７５，１４９号；および同第４，３６６，２４１号において説明されている。

【０１３９】

分子を抗体へと部位特異的に結合させるさらに別の方法は、抗体の、ハプテンベースのアフィニティー標識との反応を含む。本質的に述べると、ハプテンベースのアフィニティー標識は、抗原結合部位内のアミノ酸と反応し、これによりこの部位を破壊し、特異的な抗原反応を遮断する。しかし、抗体コンジュゲートによる抗原結合の喪失を結果としてもたらすので、これは有利となりえない。

【０１４０】

また、アジド基を含有する分子を用いて、低強度の紫外光により生成させた反応性のニトレン中間体を介してタンパク質との共有結合を形成することもできる（ＰｏｔｔｅｒおよびＨａｌｅｙ、１９８３年）。特に、プリンヌクレオチドの２－アジド類似体および８－アジド類似体が、粗細胞抽出物中のヌクレオチド結合タンパク質を同定するための部位指向型光プローブとして用いられている（ＯｗｅｎｓおよびＨａｌｅｙ、１９８７年；Ａｔｈｅｒｔｏｎら、１９８５年）。該２－アジドヌクレオチドおよび８－アジドヌクレオチドはまた、精製タンパク質のヌクレオチド結合ドメインをマップするのにも用いられており（Ｋｈａｔｏｏｎら、１９８９年；Ｋｉｎｇら、１９８９年；Ｄｈｏｌａｋｉａら、１９８９年）、かつ、抗体結合剤として用いることもできる。

【０１４１】

当技術分野では、抗体を、そのコンジュゲート部分へと結合させるかまたはコンジュゲートする複数の方法が公知である。一部の結合法は、例えば、抗体に結合させるジエチレントリアミンペンタ酢酸無水物（ＤＴＰＡ）；エチレントリアミンテトラ酢酸；Ｎ－クロロ－ｐ－トルエンスルホンアミド；および／またはテトラクロロ－３α－６α－ジフェニルグリコウリル－３などの有機キレート化剤を使用する金属キレート複合体の使用を伴う（米国特許第４，４７２，５０９号および同第４，９３８，９４８号）。また、モノクローナル抗体を、グルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸などの結合剤の存在下で、酵素と反応させることもできる。これらの結合剤の存在下において、またはイソチオシアン酸と反応させることにより、フルオレセインマーカーとのコンジュゲートを調製する。米国特許第４，９３８，９４８号では、モノクローナル抗体と、メチル－ｐ－ヒドロキシベンジミデートまたはＮ－スクシンイミジル－３－（４－ヒドロキシフェニル）プロピオネートなどのリンカーを用いて該抗体へと結合させた検出可能な造影部分とを用いて、乳癌の造影が達成されている。

【０１４２】

他の実施形態では、抗体結合部位を変化させない反応条件を用いて、免疫グロブリンのＦｃ領域内にスルフヒドリル基を選択的に導入することにより、免疫グロブリンを誘導体化することが意図される。この方法により生成される抗体コンジュゲートは、寿命、特異

性、および感受性の改善を呈示することが開示されている（参照により本明細書に組み込まれる米国特許第５，１９６，０６６号）。文献ではまた、Ｆｃ領域内の炭水化物残基へとコンジュゲートされるレポーター分子またはエフェクター分子の部位特異的な結合も開示されている（Ｏ’Ｓｈａｎｎｅｓｓｙら、１９８７年）。この手法は、現在臨床評価されている、診断的および治療的に有望な抗体を生成することが報告されている。

【０１４３】

一実施形態では、本発明が、ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、診断結果に由来するデータを送信する方法を提供する。診断アッセイを用いて、癌または自己免疫障害を検出することができる。データ送信の例は、本明細書で説明される方法およびアッセイのうちのいずれかによる結果を、インターネットへと開示することでありうる。一実施形態では、生物学的試料または被験体に対してヒト抗ヌクレオリン抗体を用いる診断方法に由来する結果を収集し、ファクシミリ、電子メール、電話、またはインターネットなどの地球規模の通信ネットワークなどによるデジタル手段を介して情報を送信する。例えば、それへの加入式アクセスもしくは限定アクセス／セキュリティーアクセスなどによるウェブサイトへの投稿を介して、かつ／または電子メールを介して、かつ／または電話、ＩＲ、ラジオ、テレビ、もしくは他の周波数信号を介して、かつ／またはケーブルにわたる電子信号を介して、かつ／または衛星による送信を介して、かつ／またはディスク、コンパクトディスク（ＣＤ）、コンピュータ、ハードディスクドライブ、もしくは電子形態内に情報を含有する他の装置を介して、かつ／または情報の書面形態の送付、例えば、ファクシミリの送信などを介してデータを送信することができる。したがって、本発明は、使用者が、本発明による方法を実施し、それに由来する情報を、例えば、１または複数の関係者に送信し、次いで、これらの関係者が、該データまたは情報のうちの一部または全部を、例えば、治療剤などの製品の製造、アッセイ、および診断検査などでさらに使用することを包含する。本発明は、ディスク、ＣＤ、コンピュータ、あるいは本発明の方法および／または本発明の方法の使用に由来する情報を含有するデータまたは情報を保存または受信もしくは送信するための他の装置または手段を包含する。したがって、本発明は、情報を送信する方法であって、本明細書で論じられる方法を実施するステップと、その結果を送信するステップとを含む方法を包含する。

【０１４４】

一態様では、本発明が、取引業務を行う方法であって、本明細書の方法の一部または全部を実施するかまたは用いるステップと、代償、例えば、手数料と引き換えであると有利である、ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いる診断アッセイの結果を通信または送信または公表するステップとを含む方法を提供する。情報を通信、送信、または公表するステップは、電子的手段を介する、例えば、インターネットもしくは電子メールを介する、または本明細書で論じられる他の任意の送信手段を介することが有利である。つまり、本発明は、取引業務を行う方法を包括する。

【０１４５】

例えば、第１の関係者である「クライアント」は、例えば、本明細書で言及される送信手段のうちのいずれかを介して、第２の関係者である「ベンダー」の情報（本発明の方法およびアッセイの結果についての、既に作成された情報または特別に注文された情報）を要望する、例えば、インターネット（例えば、ウェブサイトへと要望を入力する）を介して、または電子メールを介してなど、電子的手段を介して、情報を要望することができる。ベンダーは、例えば、インターネット（例えば、セキュリティーアクセス、または加入式アクセス、または限定アクセスによるウェブサイト）などの電子的手段を介することが有利である、本明細書で言及される送信手段のうちのいずれかを介して、該情報を送信することができる。該情報は、要望に応じて本明細書の方法のうちの一部または全部を実施するかまたは本明細書の方法を用いることに由来する場合もあり、本明細書の方法のうちの一部または全部を実施し、かつ、本明細書の方法のうちの一部または全部を実施するかまたは本明細書のアルゴリズムを用いることに由来する情報ライブラリーを生成させることに由来する場合もある。次いで、クライアントに該ライブラリーへのアクセスを許可す

るか、または要望に応じるデータをライブラリーから選択することにより、要望を満たすことができる。

【０１４６】

したがって、本発明はまた、本発明を実施するかまたは用いることに由来する情報を、例えば、電子形態（上記で論じられた送信形態など）で収集することをさらに包括する。

【０１４７】

例えば、クライアントの病院では、癌などの疾患の存在を決定する必要が生じる場合がある。本発明の方法に熟達したベンダーは、該病院からの連絡を受け、本明細書で説明される方法、または本発明により意図される他の任意の方法のうちのいずれかを用いて、被験体に由来する試料を迅速に検査またはスクリーニングすることができる。該スクリーニングの結果は、手数料と引き換えに、クライアントの病院へと返信されうる。

【０１４８】

ＶＩ．ＭＡｂの治療的使用

Ａ．ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体

一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を提供し、これを用いて癌細胞を阻害するかまたは死滅させることができる。別の実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を提供し、これを用いて癌細胞を阻害するかまたは死滅させることができる。別の実施形態では、ヒトＢ細胞により発現された単離抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を提供し、これを用いて癌細胞を阻害するかまたは死滅させることができる。一実施形態では、癌細胞が、その表面またはその細胞質においてヒトヌクレオリンを発現する。ヒト抗ヌクレオリン抗体により阻害するかまたは死滅させうる癌細胞の例には、急性リンパ芽球性白血病；骨髄性白血病；急性骨髄性白血病；慢性骨髄性白血病；副腎皮質癌；ＡＩＤＳ関連癌；ＡＩＤＳ関連リンパ腫；肛門癌；小児小脳星状細胞腫；小児大脳星状細胞腫；基底細胞癌；肝外胆管癌；膀胱癌；骨肉腫／悪性線維性組織球腫性骨癌；脳幹神経膠細胞腫；脳腫瘍；脳幹神経膠腫性脳腫瘍；小脳星状細胞腫性脳腫瘍；大脳星状細胞腫／悪性神経膠腫性脳腫瘍；脳室上皮腫性脳腫瘍；髄芽腫性脳腫瘍；テント上原始神経外胚葉腫瘍性脳腫瘍；視経路視床下部神経膠腫性脳腫瘍；女性乳癌；男性乳癌；気管支腺癌／気管支カルチノイド；バーキットリンパ腫；カルチノイド腫瘍；中枢神経系リンパ腫；小脳星状細胞腫；大脳星状細胞腫／悪性神経膠腫；子宮頚癌；慢性リンパ球性白血病；慢性骨髄性白血病；慢性骨髄増殖性障害；骨髄異形成症候群；結腸癌；結腸直腸癌；皮膚Ｔ細胞リンパ腫；Ｂ細胞リンパ腫；子宮内膜癌；脳室上皮腫；食道癌；ユーイング肉腫族の腫瘍；頭蓋外胚細胞腫瘍；肝外胆管癌；眼内黒色腫性眼癌；網膜芽腫性眼癌；胆嚢癌；胃（Ｇａｓｔｒｉｃ（Ｓｔｏｍａｃｈ））癌；消化管カルチノイド癌；頭蓋外胚細胞腫瘍；卵巣胚細胞腫瘍；妊娠性絨毛腫瘍；神経膠腫；小児脳幹神経膠腫；小児大脳星状細胞腫性神経膠腫；小児視経路視床下部神経膠腫；毛様細胞白血病；頭頚部癌；成人（原発性）肝細胞（肝）癌；小児（原発性）肝細胞（肝）癌；ホジキンリンパ腫；妊娠期ホジキンリンパ腫；下咽頭癌；視床下部視経路神経膠腫；眼内黒色腫；膵島細胞癌（膵臓内分泌部癌）；カポジ肉腫；腎（腎細胞）癌；腎癌；喉頭癌；急性リンパ芽球性白血病；急性骨髄性白血病；慢性リンパ球性白血病；慢性骨髄性白血病；口唇口腔癌；成人（原発性）肝癌；小児（原発性）肝癌；非小細胞肺癌；ＡＩＤＳ関連リンパ腫；バーキットリンパ腫；皮膚Ｔ細胞リンパ腫（菌状息肉腫およびセザリー症候群を参照されたい）；ホジキンリンパ腫；妊娠期ホジキンリンパ腫；非ホジキンリンパ腫；妊娠期非ホジキンリンパ腫；原発性中枢神経系リンパ腫；ワルデンシュトレームマクログロブリン血症；悪性線維性骨組織球腫／骨肉腫；髄芽腫；黒色腫；眼内（眼）黒色腫；メルケル細胞癌；成人悪性中皮腫；中皮腫；潜在性原発腫瘍を伴う転移性扁平細胞性頸部癌；多発性内分泌腫瘍症候群；多発性黒色腫／形質細胞腫瘍；菌状息肉腫；骨髄異形成症候群；骨髄異形成／骨髄増殖性疾患；慢性骨髄性白血病；成人急性骨髄性白血病；小児急性骨髄性白血病；多発性硬化症；慢性骨髄増殖性障害；鼻腔副鼻腔癌；鼻咽頭癌；神経芽腫；非ホジキンリンパ腫、妊娠期非ホジキンリンパ腫；口腔癌；口唇口腔癌；口腔咽頭癌；骨肉腫／悪性線維性骨組織球腫；卵巣癌；卵巣上皮癌；卵巣胚細胞腫瘍；卵巣低悪性度潜在性腫瘍；膵臓癌；膵島細胞性膵臓癌；副甲状腺癌；

陰茎癌；褐色細胞腫；松果体芽腫およびテント上原始神経外胚葉腫瘍；下垂体腫瘍；形質細胞腫／多発性黒色腫；胸膜肺芽腫；妊娠期乳癌；妊娠期ホジキンリンパ腫；妊娠期非ホジキンリンパ腫；原発性中枢神経系リンパ腫；前立腺癌；直腸癌；腎細胞（腎）癌；腎盂尿管移行上皮細胞癌；網膜芽腫；横紋筋肉腫；唾液腺癌；ユーイング肉腫族の腫瘍；カポジ肉腫；軟組織肉腫；子宮肉腫；セザリー症候群；皮膚癌（非黒色腫性皮膚癌）；皮膚癌；皮膚癌（黒色腫）；メルケル細胞性皮膚癌；小細胞肺癌；小腸癌；軟組織肉腫；扁平細胞癌（皮膚癌（非黒色腫性皮膚癌）を参照されたい）；潜在性原発腫瘍を伴う転移性扁平細胞性頸部癌；胃（Ｇａｓｔｒｉｃ（Ｓｔｏｍａｃｈ））癌；テント上原子神経外胚葉腫瘍；皮膚Ｔ細胞リンパ腫（菌状息肉腫およびセザリー症候群を参照されたい）；精巣癌；胸腺腫；胸腺腫および胸腺癌；甲状腺癌；腎盂尿管移行上皮細胞癌；妊娠性絨毛腫瘍；尿管腎盂移行上皮細胞癌；尿路癌；子宮内膜癌；子宮肉腫；膣癌；視経路視床下部神経膠腫；外陰癌；ワルデンシュトレームマクログロブリン血症；およびウィルムス腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。

【０１４９】

一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、対象試料中の癌細胞の細胞生存率を、ヒト抗ヌクレオリン抗体に曝露されていない細胞と比較して、３０～８０％低減する。一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、対象試料中の癌細胞の細胞生存率を、ヒト抗ヌクレオリン抗体に曝露されていない細胞と比較して、３０～８０％低減する。一実施形態では、ヒトＢ細胞から生成された単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を提供し、これを用いて、対象試料中の癌細胞の細胞生存率を、ヒト抗ヌクレオリン抗体に曝露されていない細胞と比較して、３０～８０％低減する。

【０１５０】

一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、被験体における癌細胞の細胞生存率を、ヒト抗ヌクレオリン抗体に曝露されていない細胞と比較して、３０～８０％低減する。一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、被験体における癌細胞の細胞生存率を、ヒト抗ヌクレオリン抗体に曝露されていない細胞と比較して、３０～８０％低減する。一実施形態では、ヒトＢ細胞から生成された単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を提供し、これを用いて、被験体における癌細胞の細胞生存率を、ヒト抗ヌクレオリン抗体に曝露されていない細胞と比較して、３０～８０％低減する。

【０１５１】

一実施形態では、１または複数の癌形態を有するヒト被験体に、ヒト抗ヌクレオリン抗体を投与する。一実施形態では、１または複数の癌形態を有するヒト被験体に、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を投与する。一実施形態では、癌の形態のうちの少なくとも１つを、ヒト抗ヌクレオリン抗体により阻害するかまたは死滅させる。一実施形態では、癌が他の癌治療に対して耐性であるヒト被験体に、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を投与する。一実施形態では、ヒトＢ細胞から生成された単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を提供し、癌が他の癌治療に対して耐性であるヒト被験体にこれを投与する。例えば、癌は、放射線療法、化学療法、または生物学的療法に対して耐性でありうる。一実施形態では、ヒト被験体の免疫系が、単離非ヒト抗ヌクレオリン抗体に対するより、単離ヒト抗ヌクレオリン抗体に対してより忍容性である。別の実施形態では、ヒト被験体の免疫系が、単離ヒト化抗ヌクレオリン抗体に対するより、単離ヒト抗ヌクレオリン抗体に対してより忍容性である。別の実施形態では、ヒト被験体の免疫系が、単離キメラ抗ヌクレオリン抗体に対するより、単離ヒト抗ヌクレオリン抗体に対してより忍容性である。

【０１５２】

一実施形態では、アジュバント療法の一部としてヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、細胞を阻害するかまたは死滅させる。一実施形態では、アジュバント療法の一部として単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、細胞を阻害するかまたは死滅させる。一実施形態では、ヒトＢ細胞により発現された単離抗ヌクレオリン抗体を提供し、これを

アジュバント療法の一部として用いる。アジュバント療法には、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、標的化療法、または生物学的療法が含まれうる。本明細書で用いられるアジュバント療法とは、一次治療の後で施され、癌が再発する危険性を低下させる治療を指す。

【０１５３】

一実施形態では、アジュバント療法と組み合わせてヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、細胞を阻害するかまたは死滅させる。一実施形態では、アジュバント療法と組み合わせて単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、細胞を阻害するかまたは死滅させる。一実施形態では、ヒトＢ細胞により発現された単離抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を、アジュバント療法の一部として提供する。アジュバント療法には、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、標的化療法、または生物学的療法が含まれうる。

【０１５４】

一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、ヌクレオリンが細胞表面または細胞質に発現される非悪性細胞増殖性障害の細胞を阻害するかまたは死滅させる。一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、ヌクレオリンが細胞表面または細胞質に発現される非悪性細胞増殖性障害の細胞を阻害するかまたは死滅させる。一実施形態では、単離抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を、ヒトＢ細胞により発現させる。例えば、抗ヌクレオリン抗体により治療または阻害されうる非悪性細胞増殖性障害の非限定的な具体例には、疣、良性前立腺過形成、スキンタグ、および非悪性腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。例えば、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、良性前立腺過形成または望ましくない生殖器疣を特徴づける望ましくない細胞を除去の標的とすることにより、このような状態などの細胞増殖性障害を決定することができる。内皮細胞の細胞表面におけるヌクレオリンの発現は、腫瘍による血管新生に固有のマーカーであることが示されている（Ｃｈｒｉｓｔｉａｎら、２００３年）。一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、被験体における、血管新生性腫瘍を含む細胞を阻害するかまたは死滅させる。一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、被験体における、血管新生性腫瘍を含む細胞を阻害するかまたは死滅させる。一実施形態では、ヒトＢ細胞により発現させた、被験体における、血管新生性腫瘍を含む細胞を阻害するかまたは死滅させることができる単離抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を提供する。本明細書で用いられる血管新生性腫瘍とは、癌性増殖部位に侵入し、栄養分および酸素を供給し、老廃物を除去する、血管ネットワークの増殖を伴う腫瘍細胞である。

【０１５５】

一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、被験体における、腫瘍による低酸素状態下にある腫瘍細胞を阻害するかまたは死滅させる。一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、被験体における、腫瘍による低酸素状態下にある腫瘍細胞を阻害するかまたは死滅させる。一実施形態では、ヒトＢ細胞により発現された単離抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を提供し、これを用いて被験体における、腫瘍による低酸素状態下にある腫瘍細胞を阻害するかまたは死滅させる。腫瘍による低酸素状態は、腫瘍細胞が酸素を奪われている状況において生じる。腫瘍による低酸素状態は、腫瘍組織内で生じる高度の細胞増殖であって、細胞密度を高度化させ、これにより、局所的な酸素供給の負荷を課する細胞増殖の結果である可能性がある。

【０１５６】

一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、被験体における、ヒトヌクレオリンをその表面に発現するリンパ球を阻害するかまたは死滅させる。一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、被験体における、ヒトヌクレオリンをその表面に発現するリンパ球を阻害するかまたは死滅させる。一実施形態では、ヒトＢ細胞により発現された単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を提供し、これを用いて、被験体における、ヒトヌクレオリンをその表面に発現するリンパ球を阻害するかまたは死滅させる。一実施形態では、リンパ球が、Ｂ細胞、Ｔ細胞、またはナチュラルキラー細

胞を含む。一実施形態では、リンパ球が、ＣＤ４陽性細胞またはＣＤ８陽性細胞を含む。

【０１５７】

一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、被験体における、ヒトヌクレオリンをその表面に発現する活性化リンパ球またはメモリー細胞を阻害するかまたは死滅させる。一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、被験体における、ヒトヌクレオリンをその表面に発現する活性化リンパ球またはメモリー細胞を阻害するかまたは死滅させる。一実施形態では、ヒトＢ細胞により発現された単離抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を提供し、これを用いて、被験体における、ヒトヌクレオリンをその表面に発現する活性化リンパ球またはメモリー細胞を阻害するかまたは死滅させる。さらなる実施形態では、活性化リンパ球が、活性化Ｂ細胞、Ｔ細胞、またはナチュラルキラー細胞を含む。一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、自己免疫障害を有する被験体における細胞を阻害するかまたは死滅させる。一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、自己免疫障害を有する被験体における細胞を阻害するかまたは死滅させる。一実施形態では、ヒトＢ細胞により発現された単離抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を提供し、これを用いて、自己免疫障害を有する被験体における細胞を阻害するかまたは死滅させる。

【０１５８】

一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、自己免疫障害を有する被験体における細胞を阻害するかまたは死滅させる。一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、自己免疫障害を有する被験体における細胞を阻害するかまたは死滅させる。一実施形態では、ヒトＢ細胞により発現させた、自己免疫障害を有する被験体における細胞を阻害するかまたは死滅させることができる単離抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を提供する。ＣＤ４０およびＣＤ４０リガンドは、Ｔ細胞依存性Ｂ細胞応答、ならびに効率的なＴ細胞のプライミングを媒介し、ヌクレオリンは、ＣＤ４０リガンドと相互作用することが示されている（Ｇｅａｈｌｅｎら、１９８４年）。一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、自己免疫障害を有する被験体における、活性化ＣＤ４０受容体を特徴とする細胞を阻害するかまたは死滅させる。一実施形態では、細胞が、その表面またはその細胞質において、ヒトヌクレオリンを発現する。一実施形態では、細胞がリンパ球である。一実施形態では、リンパ球が、Ｂ細胞またはＴ細胞である。一実施形態では、リンパ球が活性化されている。ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて診断されうる例示的な自己免疫疾患または自己免疫障害には、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、喘息、自己免疫性副腎疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎および自己免疫性抗癌炎、自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスプルー－皮膚炎、慢性疲労性免疫不全症候群（ＣＦＩＤＳ）、慢性炎症性脱髄性多発性神経障害、チャーグ－ストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡、ＣＲＥＳＴ症候群、寒冷凝集素症、クローン病、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、疱疹状皮膚炎、１型糖尿病、糖尿病性網膜症、好酸球性筋膜炎、線維筋痛症－線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン－バレー症候群、橋本甲状腺炎、ヘノッホ－シェーンライン紫斑病、特発性肺線維症、特発性／自己免疫性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、ＩｇＡ性神経障害、若年性関節炎、扁平苔癬、エリテマトーデス、メニエール病、混合型結合組織病、多発性硬化症、１型糖尿病または免疫媒介性糖尿病、重症筋無力症、天疱瘡関連障害（例えば、尋常性天疱瘡）、悪性貧血、結節性動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性自己免疫性症候群、リウマチ性多発性筋痛、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティッフマン症候群、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、スイート症候群、スティル病、エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭部動脈炎／巨細胞動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、血管炎、尋常性白斑、およびウェゲナー肉芽腫症である。炎症性障害の例には、喘息、脳炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、アレルギー性障害、敗血症性ショック、肺線維症、未分化型脊椎関節症、未分

化型関節症、関節炎、炎症性骨溶解、移植片対宿主病、蕁麻疹、またはフォークト－小柳－原田症候群、慢性炎症性肺炎、ならびに慢性ウイルス感染または慢性細菌感染から生じる慢性炎症が含まれるがこれらに限定されない。

【０１５９】

別の実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、被験体における、ウイルスに感染した細胞を阻害するかまたは死滅させる。別の実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、被験体における、ウイルスに感染した細胞を阻害するかまたは死滅させる。一実施形態では、ヒトＢ細胞により発現させた、被験体における、ウイルスに感染した細胞を阻害するかまたは死滅させうる単離抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を提供する。細胞に感染しうるウイルスの例には、Ｒｅｔｒｏｖｉｒｉｄａｅ科（例えば、ＨＩＶ－１ウイルス（また、ＨＴＬＶ－ＩＩＩウイルス、ＬＡＶウイルス、もしくはＨＴＬＶ－ＩＩＩ／ＬＡＶウイルス、またはＨＩＶ－ＩＩＩウイルスとしても言及される）；ならびにＨＩＶ－ＬＰウイルスなどの他の単離ウイルスなど、ヒト免疫不全ウイルス）；Ｐｉｃｏｒｎａｖｉｒｉｄａｅ科（例えば、ポリオウイルス、Ａ型肝炎ウイルス；エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス）；Ｃａｌｃｉｖｉｒｉｄａｅ科（例えば、胃腸炎を引き起こすウイルス株）；Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅ科（例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス）；Ｆｌａｖｉｒｉｄａｅ科（例えば、デング熱ウイルス、脳炎ウイルス、黄熱ウイルス）；Ｃｏｒｏｎａｖｉｒｉｄａｅ（Ｃｏｒｏｎｏｖｉｒｉｄａｅ）科（例えば、コロナウイルス）；Ｒｈａｂｄｏｖｉｒａｄａｅ（例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）；Ｆｉｌｏｖｉｒｉｄａｅ科（例えば、エボラウイルス）；Ｐａｒａｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅ科（例えば、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、ＲＳ（ｒｅｓｐｉｒａｔｏｒｙ ｓｙｎｃｙｔｉａｌ）ウイルス）；Ｏｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅ科（例えば、インフルエンザウイルス）；Ｂｕｎｇａｖｉｒｉｄａｅ科（例えば、ハンターンウイルス、ブンガウイルス、フレボウイルス、およびナイロウイルス）；Ａｒｅｎａｖｉｒｉｄａｅ（Ａｒｅｎａ ｖｉｒｉｄａｅ）科（出血性発熱ウイルス）；Ｒｅｏｖｉｒｉｄａｅ科（例えば、レオウイルス、オルビウイルス、およびロタウイルス）；Ｂｉｍａｖｉｒｉｄａｅ科；Ｈｅｐａｄｎａｖｉｒｉｄａｅ科（Ｂ型肝炎ウイルス）；Ｐａｒｖｏｖｉｒｉｄａｅ（Ｐａｒｖｏｖｉｒｉｄａ）科（パルボウイルス）；Ｐａｐｏｖａｖｉｒｉｄａｅ科（パピローマウイルス、ポリオーマウイルス）；Ａｄｅｎｏｖｉｒｉｄａｅ科（大半のアデノウイルス）；Ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｉｄａｅ科（単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）１および２、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、ヘルペスウイルス）；ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）、トリ白血病ウイルス（ＡＬＶ）、およびトリ骨芽球症ウイルス（ＡＭＶ）；ならびにＣ型哺乳動物レトロウイルスＢ群（ネコ白血病ウイルス（ＦｅＬＶ）、テナガザル白血病ウイルス（ＧＡＬＶ）、脾臓壊死ウイルス（ＳＮＶ）、細膜内皮症ウイルス（ＲＶ）、およびサル肉腫ウイルス（ＳＳＶ））；マソン－ファイザーサルウイルス（ＭＰＭＶ）および１型サルレトロウイルス（ＳＲＶ－１）を含めたＤ型レトロウイルス；レンチウイルスのサブグループ、Ｔ細胞白血病ウイルス、および泡沫状ウイルスを含めたコンプレックスレトロウイルス；ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２、ＳＩＶ、ビスナウイルス、ネコ免疫不全ウイルス（ＦＩＶ）、およびウマ感染性貧血症ウイルス（ＥＩＡＶ）を含めたレンチウイルス；サルＴ細胞白血病ウイルス（ＳＴＬＶ）、およびウシ白血病ウイルス（ＢＬＶ）；ヒト泡沫状ウイルス（ＨＦＶ）、サル泡沫状ウイルス（ＳＦＶ）、およびウシ泡沫状ウイルス（ＢＦＶ）を含めた泡沫状ウイルス；Ｐｏｘｖｉｒｉｄａｅ（Ｐｏｘｙｉｒｉｄａｅ）科（痘瘡ウイルス、牛痘ウイルス、ポックスウイルス）；ならびにＩｒｉｄｏｖｉｒｉｄａｅ科（例えば、アフリカブタ熱ウイルス）；ならびに分類不明ウイルス（例えば、海綿状脳症の病原ウイルス、デルタ肝炎の病原ウイルス（Ｂ型肝炎ウイルスの欠陥サテライトウイルスであると考えられている）、非Ａ型、非Ｂ型肝炎の病原ウイルス（クラス１＝内部感染型ウイルス；クラス２＝非経口感染型ウイルス（すなわち、Ｃ型肝炎ウイルス））；ノーウォークウイルスならびに類縁のウイルス；ならびにアストロウイルス）、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ属（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂ

ｅｒｃｕｌｏｓｉｓ、Ｍ．　ｂｏｖｉｓ、Ｍ．　ａｖｉｕｍ－ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒｅ、Ｍ．　ｌｅｐｒａｅ）、Ｐｎｅｕｍｏｃｏｃｃｕｓ属、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ属、Ｓｔａｐｈｙｌｃｏｃｏｃｃｕｓ属、Ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａ属、Ｌｉｓｔｅｒｉａ属、Ｅｒｙｓｉｐｅｌｏｔｈｒｉｘ属、炭素菌、破傷風菌、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ属、混合型嫌気性細菌、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ属、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ属、Ｓｈｉｇｅｌｌａ属、Ｈｅｍｏｐｈｉｌｕｓ属、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ、Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ属、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ属、Ｓｅｒｒａｔｉａ属、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ属、Ｂｏｒｄａｔｅｌｌａ属、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ、Ｙｅｒｓｉｎｉａ属、Ｖｉｂｒｉｏ　ｃｈｏｌｅｒａｅ、Ｂａｒｔｏｎｅｌｌａ属、Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ属、Ｓｐｉｒｏｃｈａｅｔｅｓ属（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ属、Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ属、Ｂｏｒｒｅｌｉａ属）、真菌、Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｓ属、Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ属、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ属、Ｃｈｌａｍｙｄｉａ属、原虫（Ｅｎｔａｍｏｅｂａ属、Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ属、Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ属、Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ属、Ｔｏｘｏｐｌａｓｍａ属、Ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ属、Ｂａｂａｓｉａ属、Ｇｉａｒｄｉａ属、Ｃｒｙｐｔｏｓｐｏｒｉｄｉｕｍ属、Ｔｒｉｃｈｏｍｏｎａｓ属を含めた）、蠕虫（Ｔｒｉｃｈｉｎｅｌｌａ属、Ｗｕｃｈｅｒａｒｉａ属、Ｏｎｃｈｏｃｅｒｃａ属、Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ属、線虫、条虫、吸虫）、ならびにウイルス性肺炎ウイルスが含まれるがこれらに限定されない。米国特許公開第２００７／００６６５５４号において開示されている抗原など、本発明の組成物の標的となりうるさらなる抗原の例が公知である。本発明のさらなる態様では、コンジュゲートが、本明細書で説明される抗原または細胞の構成要素を含みうるが、これは、標的化部分および免疫刺激性核酸分子に加えて含まれるものである。

【０１６０】

一実施形態では、疾患が存在する指標として、ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて、被験体に由来する試料における細胞を阻害するかまたは死滅させる。一実施形態では、疾患の予後診断指標として、単離ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を用いて、被験体に由来する試料における細胞を阻害するかまたは死滅させる。一実施形態では、ヒトＢ細胞により発現された単離抗ヌクレオリンモノクローナル抗体を提供し、これを用いて、疾患の予後診断指標として、被験体に由来する試料における細胞を阻害するかまたは死滅させる。検査される疾患の例には、悪性腫瘍、非悪性腫瘍、癌、自己免疫疾患、炎症性疾患、および感染性疾患が含まれるがこれらに限定されない。

【０１６１】

Ｂ．抗体コンジュゲート

一実施形態では、本発明が、少なくとも１つの治療剤に連結されて、抗体コンジュゲートを形成する、単離ヒト抗ヌクレオリン抗体を提供する。一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリン抗体を、分子または部分など、少なくとも１つの治療剤に連結するか、共有結合させるか、またはこれと複合体化させる。治療剤は、所望の活性、例えば、細部傷害活性を有する分子を含む。一実施形態では、抗体に結合させうる治療剤に、本明細書で説明される、毒素（タンパク質合成の伸長ステップを触媒的に阻害する、ペプチドのイムノトキシンなど）、抗腫瘍剤、治療用酵素、放射性核種、抗ウイルス剤、キレート化剤；サイトカイン、増殖因子、またはオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドが含まれるがこれらに限定されない。コンジュゲーション法は、診断剤について上記で説明したコンジュゲーション法と同様である。

【０１６２】

一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリン抗体を、酵素的に活性な毒素またはその断片にコンジュゲートする。酵素的に活性な毒素ならびにそれらの断片には、ジフテリアＡ鎖、ジフテリア毒素の非結合型活性断片、外毒素Ａ鎖（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａに由来する）、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシンＡ鎖、アルファ－サルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ　ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ジアンチンタンパク質、Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ（Ｐｈｙｔｏｌａｃａ）　ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質（ＰＡＰＩ、

ＰＡＰＩＩ、およびＰＡＰ－Ｓ）、ブタクサ抗ウイルス性タンパク質、Ｍｏｍｏｒｄｉｃａ（ｍｏｍｏｒｄｉｃａ）ｃｈａｒａｎｔｉａ阻害剤、クルシン、クロチン、Ｓａｐａｏｎａｒｉａ（ｓａｐａｏｎａｒｉａ）ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、カリケアマイシン、またはトリコテセンが含まれるがこれらに限定されない。

【０１６３】

別の実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリン抗体を、放射性核種にコンジュゲートする。適切な放射性核種の例には、$^{124}$アンチモン、$^{125}$アンチモン、$^{74}$ヒ素、$^{211}$アスタチン、$^{103}$バリウム、$^{140}$バリウム、$^{7}$ベリリウム、$^{206}$ビスマス、$^{207}$ビスマス、$^{212}$Ｂｉ、$^{109}$カドミウム、$^{115}$カドミウム、$^{45}$カルシウム、$^{14}$炭素、$^{139}$セリウム、$^{141}$セリウム、$^{144}$セリウム、$^{137}$セシウム、$^{51}$クロム、$^{36}$塩素、$^{56}$コバルト、$^{57}$コバルト、$^{58}$コバルト、$^{60}$コバルト、$^{67}$銅、$^{169}$エルビウム、$^{152}$ユーロピウム、$^{67}$ガリウム、$^{153}$ガドリニウム、$^{195}$金、$^{199}$金、$^{175}$ハフニウム、$^{175+181}$ハフニウム、$^{181}$ハフニウム、$^{3}$水素、$^{123}$ヨウ素、$^{125}$ヨウ素、$^{131}$ヨウ素、$^{111}$インジウム、$^{131}$Ｉｎ、$^{192}$イリジウム、$^{55}$鉄、$^{59}$鉄、$^{85}$クリプトン、$^{210}$鉛、$^{177}$ルテチウム、$^{54}$マンガン、$^{197}$水銀、$^{203}$水銀、$^{99}$モルビデン、$^{147}$ネオジミウム、$^{237}$ネプツニウム、$^{63}$ニッケル、$^{95}$ニオビウム、$^{185+191}$オスミウム、$^{103}$パラジウム、$^{32}$リン、$^{184}$白金、$^{143}$プラセオジミウム、$^{147}$プロメチウム、$^{233}$プロトアクチニウム、$^{226}$ラジウム、$^{186}$レニウム、$^{188}$レニウム、$^{86}$ルビジウム、$^{130}$ルテニウム、$^{106}$ルテニウム、$^{44}$スカンジウム、$^{46}$スカンジウム、$^{45}$セレニウム、$^{75}$セレニウム、$^{110m}$銀、$^{111}$銀、$^{22}$ナトリウム、$^{85}$ストロンチウム、$^{89}$ストロンチウム、$^{90}$ストロンチウム、$^{35}$硫黄、$^{182}$タンタル、$^{99m}$テクネチウム、$^{125m}$テルリウム、$^{132}$テルリウム、$^{160}$テルビウム、$^{204}$タリウム、$^{228}$トリウム、$^{232}$トリウム、$^{170}$ツリウム、$^{113}$スズ、$^{44}$チタン、$^{185}$タングステン、$^{48}$バナジウム、$^{49}$バナジウム、$^{88}$イットリウム、$^{90}$イットリウム、$^{91}$イットリウム、$^{169}$イッテルビウム、$^{65}$亜鉛、および／または$^{95}$ジルコニウムが含まれるがこれらに限定されない。

【０１６４】

Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオール）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステル（アジプイミド酸ジメチルＨＣｌ塩など）の二官能性誘導体、活性エステル（スベリン酸ジスクシンイミジルなど）、アルデヒド（グルタルアルデヒド（ｇｌｕｔａｒｅｌｄｅｈｙｄｅ）など）、ビスアジド化合物（ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミンなど）、ビス－ジアゾニウム誘導体（ビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）エチレンジアミンなど）、ジイソシアン酸（トルエン－２，６－ジイソシアネート（ｔｏｌｙｅｎｅ　２，６－ｄｉｉｓｏｃｙａｎａｔｅ）など）、およびビス－活性フッ素化合物（１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼンなど）など、各種の二官能性タンパク質結合剤を用いて、抗体と細胞傷害剤とのコンジュゲートを作製することができる。例えば、Ｖｉｔｅｔｔａら（１９８７年）において説明される通りに、リシンイムノトキシンを調製することができる。炭素１４で標識された１－イソチオシアネートベンジル－３－メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（ＭＸ－ＤＴＰＡ）は、放射性核種を抗体へとコンジュゲートするための例示的なキレート化剤である。ＷＯ９４／１１０２６を参照されたい。

【０１６５】

一実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリン抗体を、サイトカインにコンジュゲートする。「サイトカイン」という用語は、１つの細胞集団により放出されて、別の細胞に対して細胞間メディエーターとして作用するタンパク質についての一般的な用語である。このようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、および従来のポリペプチドホルモンである。サイトカインには、ヒト成長ホルモン、Ｎ－メチオニルヒト成長ホルモン、およびウシ成長ホルモンなどの成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン

；プロインスリン；リラキシン；プロリラキシン；濾胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）、甲状腺刺激ホルモン（ＴＳＨ）、および黄体形成ホルモン（ＬＨ）などの糖タンパク質ホルモン；肝細胞増殖因子；線維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤性ラクトゲン；腫瘍壊死因子αおよび腫瘍壊死因子β；ミュラー管抑制因子；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮細胞増殖因子；インテグリン；トロンボポエチン（ＴＰＯ）；ＮＧＦ－βなどの神経細胞増殖因子；腱相伴増殖因子；ＴＧＦ－αおよびＴＧＦ－βなどの形質転換増殖因子（ＴＧＦ）；インスリン様増殖因子Ｉおよびインスリン様増殖因子ＩＩ；エリスロポエチン（ＥＰＯ）；骨誘導性因子；インターフェロンα、インターフェロンβ、およびインターフェロンγなどのインターフェロン；マクロファージＣＳＦ（Ｍ－ＣＳＦ）、顆粒球マクロファージＣＳＦ（ＧＭ－ＣＳＦ）、および顆粒球ＣＳＦ（Ｇ－ＣＳＦ）などのコロニー刺激因子（ＣＳＦ）；ＩＬ－１、ＩＬ－１ａ、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２などのインターロイキン（ＩＬ）；ならびにＬＩＦおよびＫｉｔリガンド（ＫＬ）を含めた他のポリペプチド因子が含まれる。本明細書で用いられるサイトカインという用語は、天然の供給源または組換え細胞培養物に由来するタンパク質、ならびに天然配列のサイトカインの、生物学的に活性な同等物を包含する。

【０１６６】

別の実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリン抗体を、化学療法剤にコンジュゲートする。「化学療法剤」としても言及される各種の化合物は、ＤＮＡ損傷を誘導するように機能する。単離ヒト抗ヌクレオリン抗体とのコンジュゲーションに適する化学療法剤のカテゴリーには、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞骨格破壊剤、エポチロン、トポイソメラーゼＩ阻害剤、トポイソメラーゼＩＩ阻害剤、ヌクレオシド類似体およびヌクレオチド類似体、前駆体類似体、ペプチド抗生物質、白金ベースの薬剤、レチノイドまたはビンカアルカロイドおよび誘導体が含まれるがこれらに限定されない。これらの群内の具体的な化学療法剤には、アクチノマイシン－Ｄ、ａｌｌ－ｔｒａｎｓレチノイン酸、アザシチジン、アドリアマイシン、アザチオプリン、ブレオマイシン、カンプトテシン、カルボプラチン、カペシタビン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エポチロン、エトポシド、フルオロウラシル、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、過酸化水素、イダルビシン、イマチニブ、メクロレタミン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシンＣ、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、バルルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビンが含まれるがこれらに限定されない。本発明はまた、シスプラチンを伴うＸ線の使用、またはエトポシドを伴うシスプラチンの使用など、放射線ベースの組合せであれ、実化合物の組合せであれ、１または複数のＤＮＡ損傷剤の組合せの使用も包含する。

【０１６７】

別の実施形態では、単離ヒト抗ヌクレオリン抗体を、抗ウイルス剤にコンジュゲートする。単離ヒト抗ヌクレオリン抗体と共に用いうる抗ウイルス剤の例には、ウイルス感染細胞を十分に損なうか、衰弱させるか、または他の形で破壊する基質および基質類似体、阻害剤、ならびに他の薬剤が含まれるがこれらに限定されない。基質類似体には、アミノ酸類似体およびヌクレオシド類似体が含まれる。基質を、毒素または他の殺ウイルス性物質とコンジュゲートすることができる。阻害剤には、インテグラーゼ阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、ポリメラーゼ阻害剤、および逆転写酵素阻害剤などの転写酵素阻害剤が含まれる。

【０１６８】

単離ヒト抗ヌクレオリン抗体と共に用いうる具体的な抗ウイルス剤には、ガンシクロビル、バルガンシクロビル、オセルタミビル（Ｔａｍｉｆｌｕ）、ザナミビル（Ｒｅｌｅｎｚａ）、アバカビル、アシクロビル（ａｃｉｃｌｏｖｉｒ、ａｃｙｃｌｏｖｉｒ）、アデフォビル、アマンタジン、アンプレナビル、アンプリゲン、アルビドール、アタザナビル

、アトリプラ、ボセプレビル、シドフォビル、コンビビル、ダルナビル、デラビルジン、ジダノシン、ドコサノール、エドクスジン、エファビレンズ、エムトリシタビン、エンフビルチド、エンテカビル、ファムシクロビル、フォミビルセン、フォサムプレナビル、フォスカルネット、フォスフォネット、融合阻害剤（例えば、エンフビルチド）、イバシタビン、イムノビル、イドクスウリジン、イミキモド、インジナビル、イノシン、インテグラーゼ阻害剤、ＩＩＩ型インターフェロン、ＩＩ型インターフェロン、Ｉ型インターフェロン、インターフェロン、ラミブジン、ロピナビル、ロビリド、マラビロク、モロキシジン、ネルフィナビル、ネビラピン、ネキサビル、ヌクレオシド類似体、ＰＥＧ化インターフェロンアルファ２ａ、ペンシクロビル、ペラミビル、プレコナリル、ポドフィロトキシン、プロテアーゼ阻害剤、レルタグラビル、逆転写酵素阻害剤、リバビリン、リマンタジン、リトナビル、抗ウイルス性ピリミジン、サクイナビル、スタブジン、相乗作用性エンハンサー（抗レトロウイルス性）、テノフォビル、テノフォビルジソプロキシル、チプラナビル、トリフルリジン、トリジビル、トロマンタジン、ツルバダ、バラシクロビル（Ｖａｌｔｒｅｘ）、ビクリビロク、ビダラビン、ビラミジン、ザルシタビン、およびジドブジンが含まれるがこれらに限定されない。

【０１６９】

単離ヒト抗ヌクレオリン抗体と共に用いうるヌクレオシド類似体の例には、アシクロビル（ＡＣＶ）、ガンシクロビル（ＧＣＶ）、ファムシクロビル、フォスカルネット、リバビリン、ザルシタビン（ｄｄＣ）、ジドブジン（ＡＺＴ）、スタブジン（Ｄ４Ｔ）、ラルニブジン（３ＴＣ）、ジダノシン（ｄｄＩ）、シタラビン、ジデオキシアデノシン、エドクスジン、フロキシウリジン、イドズリジン、イノシンプラノベクス、２’－デオキシ－５－（メチルアミノ）ウリジン、トリフルリジン、およびビダラビンが含まれる。

【０１７０】

Ｃ．医薬組成物および投与

それを必要とする被験体に投与するためには、抗体を、宿主への投与に適する製剤中に懸濁させる。一実施形態では、抗体が、モノクローナル抗体である。一実施形態では、モノクローナル抗体が、抗ヌクレオリン抗体である。一実施形態では、抗ヌクレオリンモノクローナル抗体が、ヒト抗ヌクレオリンモノクローナル抗体である。本発明の水性組成物は、薬学的に許容される製剤中および／または水性媒体中に分散させた有効量の抗体を含む。「薬学的に許容され、かつ／または薬理学的に許容される」という語句は、必要に応じて、動物、具体的には、ヒトに投与したときに、有害反応、アレルギー反応、ならびに／または他の望ましくない反応をもたらさない組成物を指す。

【０１７１】

本明細書で用いられる「薬学的に許容される担体」には、任意の溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および／または抗真菌剤、等張剤および／または吸収遅延剤などが含まれる。当技術分野では、このような媒体または薬剤を薬学的に活性な物質に用いることが周知である。従来の任意の媒体または薬剤が有効成分に適合しない場合を除き、治療組成物におけるその使用が意図される。また、補助有効成分も、組成物中に組み込むことができる。ヒトに投与する場合は、調製物が、ＦＤＡのＯｆｆｉｃｅ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ基準により要請される無菌性基準、発熱性物質基準、一般的な安全性基準、および／または純度基準を満たすべきである。

【０１７２】

一実施形態では、本発明のヒト抗ヌクレオリン抗体を、生理食塩液、緩衝生理食塩液、デキストロース、および水が含まれるがこれらに限定されない、任意の生体適合性の滅菌医薬担体により投与することができる。これらの分子のうちのいずれかを、単独で、または、それが適切な賦形剤（複数可）、アジュバント、および／または薬学的に許容される担体と混合される医薬組成物中の他の薬剤、薬物、またはホルモンと組み合わせて患者に投与することができる。本発明の一実施形態では、薬学的に許容される担体が、薬学的に不活性である。

【０１７３】

医薬組成物の投与は、経口的に達成することもでき、非経口的に達成することもできる。非経口送達の方法には、局所投与、動脈内投与（例えば、腫瘍への直接的な投与）、筋肉内投与、皮下投与、髄内投与、髄腔内投与、脳室内投与、静脈内投与、腹腔内投与、または鼻腔内投与が含まれる。有効成分に加え、これらの医薬組成物は、活性化合物を、医薬として用いうる調製物へと加工することを容易にする賦形剤ならびに他の化合物を含む、適切な、薬学的に許容される担体を含有しうる。調合および投与の技法についてのさらなる詳細は、「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ」、（Ｍａａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ、Ｅａｓｔｏｎ、Ｐａ．）の最新版において見出すことができる。

【０１７４】

経口投与用の医薬組成物は、当技術分野において周知の薬学的に許容される担体を用いて、経口投与に適する用量で調合することができる。このような担体は、医薬組成物が、患者による服用に適する、錠剤、丸薬、トローチ、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして調合されることを可能とする。ＰＣＴ公開第ＷＯ９３／２３５７２号を参照されたい。

【０１７５】

経口で用いられる医薬調製物は、活性化合物を、固体の賦形剤と混合することにより、所望の場合、錠剤またはトローチのコアを得るのに適するさらなる化合物を添加した後で、場合によって、結果として得られる混合物を磨り潰し、顆粒状の混合物を加工して得ることができる。適切な賦形剤は、ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトールを含めた糖；トウモロコシ、コムギ、コメ、バレイショ、または他の植物に由来するデンプン；メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはカルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース；ならびにアラビアガムおよびトラガカントガムを含めたガム；ならびにゼラチンおよびコラーゲンなどのタンパク質が含まれるがこれらに限定されない、炭水化物またはタンパク質による充填剤である。所望の場合は、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸、またはアルギン酸ナトリウムなどのその塩など、崩壊剤または可溶化剤を添加することができる。

【０１７６】

トローチコアは、濃縮された糖溶液など、適切なコーティングと共に提供されるが、このコーティングはまた、アラビアガム、滑石、ポリビニルピロリドン、カーボポールゲル、ポリエチレングリコール、および／または二酸化チタン、ラッカー溶液、ならびに適切な有機溶媒または有機溶媒混合物も含有しうる。製品を同定するか、または活性化合物の量（すなわち、用量）を特徴づけるために、錠剤またはトローチコーティングに染料または色素を添加することもできる。

【０１７７】

経口で用いうる医薬調製物には、ゼラチン製のプッシュ－フィットカプセルのほか、ゼラチンおよびグリセロールまたはソルビトールなどのコーティングにより作製される密封型軟質カプセルも含まれる。プッシュフィットカプセルは、ラクトースまたはデンプンなどの充填剤または結合剤、滑石またはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、および、場合によって安定化剤と混合された有効成分を含有しうる。軟質カプセルでは、安定化剤を伴うかまたは伴わない、油脂、液体パラフィン、または液体ポリエチレングリコールなどの適切な液体中に、活性化合物を溶解または懸濁させることができる。

【０１７８】

非経口投与用の医薬製剤には、活性化合物の水溶液が含まれる。注射するには、本発明の医薬組成物を、水溶液により、好ましくは、ハンクス液、リンゲル液、または緩衝生理食塩液など、生理学的に適合する緩衝液により調合することができる。注射用水性懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランなど、懸濁液の粘稠度を増大させる物質を含有しうる。加えて、活性化合物の懸濁液は、適切な注射用油性懸濁液として調製することもできる。適切な親油性溶媒または親油性媒体には、ゴマ油などの油脂、またはオレイン酸エチルもしくはトリグリセリドなどの合成脂肪酸

エステル、またはリポソームが含まれる。場合によって、懸濁液はまた、化合物の可溶性を増大させて、高度に濃縮された溶液の調製を可能とするのに適する安定化剤または薬剤も含有しうる。

【０１７９】

局所投与または鼻腔内投与のためには、透過される特定の障壁に適する透過剤を製剤中で用いる。当技術分野では一般に、このような透過剤が公知である。

【０１８０】

本発明の医薬組成物は、当技術分野において公知である方法と類似の方法により（例えば、従来の混合工程、溶解工程、顆粒化工程、トローチ作製工程、湿式粉砕工程、乳化工程、カプセル化工程、封入工程、または凍結乾燥工程により）製造することができる。

【０１８１】

医薬組成物は、塩として提供することが可能であり、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するアニオンなどのアニオンにより形成される酸、ならびにナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、２－エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するカチオンなどのカチオンにより形成される酸が含まれるがこれらに限定されない多くの酸によりこれを形成することができる。塩は、水性溶媒、または対応する遊離塩基形態である他のプロトン性溶媒中で可溶性を増大させる傾向がある。他の場合には、調製物が、使用前に緩衝液と混合したときのｐＨ範囲が４．５～５．５である、１ｍＭ～５０ｍＭヒスチジン、０．１％～２％スクロース、２％～７％マンニトール中の凍結乾燥粉末でありうる。

【０１８２】

担体はまた、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体のポリエチレングリコールなど）、これらの適切な混合物、ならびに植物油を含有する溶媒または分散媒でもありうる。適正な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングを用いることにより、分散液の場合には必要とされる粒子サイズを維持することにより、ならびに界面活性剤を用いることにより維持することができる。微生物作用の阻止は、各種の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサールなどによりもたらすことができる。多くの場合には、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含有することが好ましい。注射用組成物の遅延吸収は、吸収遅延化剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物中で用いることによりもたらすことができる。

【０１８３】

許容される担体中で調合された本発明の化合物を含む医薬組成物を調製したら、これらを適切な容器内に入れ、適応の状態の治療について表示する。ヒトテロメラーゼのタンパク質および核酸の投与では、このような表示が、投与量、投与頻度、および投与方法を包含する。

【０１８４】

本発明で用いるのに適する医薬組成物は、意図される目的を達成するのに有効な量で有効成分を含有する組成物を包含する。「治療有効量」または「薬理学的有効量」とは、十分に認知された語句であり、意図される薬理学的結果をもたらすのに有効な量の薬剤を指す。したがって、治療有効量とは、治療される疾患の症状を改善するのに十分な量である。所与の適用に有効な量（例えば、治療有効量）を確認するのに有用な１つのアッセイは、細胞の存続に対する効果の測定である。実際に投与する量を、治療が適用される個体に依存し、著明な副作用なしに所望の効果が達成されるように最適化された量とすることが好ましい。

【０１８５】

いずれの化合物についてもまず、治療有効用量を、細胞培養アッセイにより、または任意の適切な動物モデルにより推定することができる。動物モデルはまた、所望の濃度範囲および投与経路を達成するのにも用いられる。次いで、このような情報を用いて、ヒトにおける投与のための用量および経路を決定する。

【０１８６】
動物における「治療有効量」とは、治療がなされない場合に典型的な臨床転帰と比較して、治療結果としての臨床転帰の改善を結果としてもたらす量の化合物である。「臨床転帰の改善」とは、例えば、治療の結果としての平均余命の延長、合併症の減少、症状の減少、身体的不快感の軽減、および／または入院回数の減少を指す。臨床転帰の改善は、ある期間にわたり、投与を受け、疾患状態を改善させる被験体の一定の百分率として定量化することができる。投与を受け、疾患状態を改善させる被験体の一定の百分率は、約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、または１０％でありうる。投与を受け、疾患状態を改善させる被験体の一定の百分率は、約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、または８５％でありうる。投与を受け、疾患状態を改善させる被験体の一定の百分率は、約８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％でありうる。臨床転帰の改善を測定するための一定の期間は１、２、３、４、５、６、または７日間でありうる。臨床転帰の改善を測定するための一定の期間は１、２、３、または４週間でありうる。臨床転帰の改善を測定するための一定の期間は１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０年以上でありうる。

【０１８７】
癌に関する「臨床転帰の改善」には、平均余命の延長が含まれる。臨床転帰の改善にはまた、腫瘍増殖の速度を遅延させるかまたは腫瘍増殖を停止させること、腫瘍サイズの縮小を引き起こすこと、転移速度を低減すること、または生活の質を改善すること（例えば、身体的な不快感の軽減、または運動の増大）も含まれる。

【０１８８】
免疫系の調節に関する「臨床転帰の改善」とは、個体が免疫抑制を伴う疾患を有する場合に、該個体における免疫反応の大きさが増大することを指す。免疫系が抑制された個体についての「臨床転帰の改善」とはまた、感染性疾患に対する感受性の低下も指す場合がある。免疫系の過剰反応を伴う疾患についての「臨床転帰の改善」とは、免疫反応の大きさの減少を指す場合がある。上記で説明した通り、いずれの場合においても、臨床転帰の改善はまた、生活の質の改善も伴いうる。

【０１８９】
治療有効量とは、症状または状態を改善する量のタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、抗体、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストを指す。このような化合物の治療有効性および毒性は、細胞培養物または実験動物における標準的な薬学手順（例えば、集団の５０％における治療有効量である$ED_{50}$；および集団の５０％に対する致死量である$LD_{50}$）により決定することができる。治療効果と毒性作用との間の用量比を治療指数とし、これを比$ED_{50}$／$LD_{50}$として表わすことができる。大きな治療指数を呈示する医薬組成物が好ましい。細胞培養物アッセイおよび動物研究から得られるデータを、ヒトへの使用のための用量範囲を処方するのに用いる。このような化合物の用量は、毒性をほとんどまたはまったく示さない$ED_{50}$が含まれる循環濃度の範囲内にあることが好ましい。用量は、使用される剤形、患者の感受性、および投与経路に応じて、この範囲内で変化する。

【０１９０】
正確な用量は、治療される患者を視野に入れた個々の医師により選択される。十分なレベルの活性部分を供給するか、または所望の効果を維持するように、用量および投与を調整する。考慮に入れうるさらなる因子には、疾患状態の重症度（例えば、腫瘍のサイズおよび位置；患者の年齢、体重、および性別；食餌；投与の回数および頻度；薬物の組合せ（複数可）；反応に対する過敏性；ならびに療法に対する忍容性／療法への反応）が含まれる。投与は、毎日、隔日、毎週、隔週、毎月、隔月、またはこれらの任意の変化形でありうる。ヒト抗ヌクレオリン抗体を含む剤形の投与は、少なくとも、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０日間にわたりうる。ヒト抗ヌクレオリン抗体を含む剤形の投与は、少なくとも、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０週間にわたりう

る。ヒト抗ヌクレオリン抗体を含む剤形の投与は、少なくとも、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２ヶ月にわたりうる。ヒト抗ヌクレオリン抗体を含む剤形の投与は、少なくとも、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２年間にわたりうる。１または複数の薬剤（例えば、ヒト抗ヌクレオリン抗体および他の薬剤）の投与は、間欠的でありうる；例えば、投与は、２日毎、３日毎、５日毎、毎週１回、毎月１または２回などでありうる。長期作用型の医薬組成物は、具体的な製剤の半減期およびクリアランス速度に応じて、３～４日間毎、毎週、または隔週で１回投与しうる。具体的な用量および送達法についての指針は、文献（参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第４，６５７，７６０号；同第５，２０６，３４４号；および同第５，２２５，２１２号を参照されたい）において示されている。一実施形態では、患者に投与される、ヒト抗ヌクレオリン抗体を含む組成物の用量が、患者の体重の約０．１ｍｇ／ｋｇ～５００ｍｇ／ｋｇである。量、形態、および／または異なる形態の量は、投与回数が異なるのに応じて変化しうる。一実施形態では、ヒト抗ヌクレオリン抗体を被験体に投与する。被験体は、男性の場合もあり、女性の場合もあり、かつ、白人、アフリカ系アメリカ人、アフリカ人、アジア人、ラテン系アメリカ人、インド人などが含まれるがこれらに限定されない任意の人種または民族でありうる。被験体は、新生児（ｎｅｗｂｏｒｎ、ｎｅｏｎａｔｅ）、乳児、小児、青年、成人、および高齢者を含めた任意の年齢でありうる。被験体にはまた、獣医学または医薬開発の目的でスクリーニングされる動物被験体、特に、イヌ、ネコ、ウマ、マウス、ラットなどの哺乳動物被験体も含まれうる。被験体にはさらに、癌などの増殖性障害、または自己免疫性障害、ＨＩＶまたはＡＩＤＳなどのウイルス性障害を有するか、これらに曝露されたことがあるか、またはこれらに罹患しているとかつて診断されたことがある被験体が含まれるがこれらに限定されない。

【０１９１】

Ｄ．ヌクレオリン発現癌および非悪性細胞

一実施形態において、本発明に従って作製された、単離ヒト抗ヌクレオリン抗体は、癌細胞および非癌細胞の両方を含む様々な細胞の治療に使用される。一実施形態において、単離ヒト抗ヌクレオリン抗体はモノクローナル抗体である。別の実施形態において、単離ヒト抗ヌクレオリン抗体はポリクローナル抗体である。「癌」という用語は、本明細書においてすでに記載している。単離ヒト抗ヌクレオリン抗体を用いて阻害または治療され得る癌の型の例は、限定するものではないが、急性リンパ芽球性白血病；骨髄性白血病；急性骨髄性白血病；慢性骨髄性白血病；副腎皮質癌；ＡＩＤＳ関連癌；ＡＩＤＳ関連リンパ腫；肛門癌；小児小脳星状細胞腫；小児大脳星状細胞腫；基底細胞癌；肝外胆管癌；膀胱癌；骨肉腫／悪性線維性組織球腫性骨癌；脳幹神経膠細胞腫；脳腫瘍；脳幹神経膠腫性脳腫瘍；小脳星状細胞腫性脳腫瘍；大脳星状細胞腫／悪性神経膠腫性脳腫瘍；脳室上皮腫性脳腫瘍；髄芽腫性脳腫瘍；テント上原始神経外胚葉腫瘍性脳腫瘍；視経路視床下部神経膠腫性脳腫瘍；女性乳癌；男性乳癌；気管支腺癌／気管支カルチノイド；バーキットリンパ腫；カルチノイド腫瘍；中枢神経系リンパ腫；小脳星状細胞腫；大脳星状細胞腫／悪性神経膠腫；子宮頚癌；慢性リンパ球性白血病；慢性骨髄性白血病；慢性骨髄増殖性障害；結腸癌；結腸直腸癌；皮膚Ｔ細胞リンパ腫；Ｂ細胞リンパ腫；子宮内膜癌；脳室上皮腫；食道癌；ユーイング肉腫族の腫瘍；頭蓋外胚細胞腫瘍；肝外胆管癌；眼内黒色腫性眼癌；網膜芽腫性眼癌；胆嚢癌；胃（Ｇａｓｔｒｉｃ（Ｓｔｏｍａｃｈ））癌；消化管カルチノイド癌；頭蓋外胚細胞腫瘍；卵巣胚細胞腫瘍；妊娠性絨毛腫瘍；神経膠腫；小児脳幹神経膠腫；小児大脳星状細胞腫性神経膠腫；小児視経路視床下部神経膠腫；毛様細胞白血病；頭頚部癌；成人（原発性）肝細胞（肝）癌；小児（原発性）肝細胞（肝）癌；ホジキンリンパ腫；妊娠期ホジキンリンパ腫；下咽頭癌；視床下部視経路神経膠腫；眼内黒色腫；膵島細胞癌（膵臓内分泌部癌）；カポジ肉腫；腎（腎細胞）癌；腎癌；喉頭癌；急性リンパ芽球性白血病；急性骨髄性白血病；慢性リンパ球性白血病；慢性骨髄性白血病；口唇口腔癌；成人（原発性）肝癌；小児（原発性）肝癌；非小細胞肺癌；ＡＩＤＳ関連リンパ腫；バーキットリンパ腫；皮膚Ｔ細胞リンパ腫（菌状息肉腫およびセザリー症候群を参照されたい）；ホジキンリンパ腫；妊娠期ホジキンリンパ腫；非ホジキンリンパ腫；妊娠期非ホジ

キンリンパ腫；原発性中枢神経系リンパ腫；ワルデンシュトレームマクログロブリン血症；悪性線維性骨組織球腫／骨肉腫；髄芽腫；黒色腫；眼内（眼）黒色腫；メルケル細胞癌；成人悪性中皮腫；中皮腫；潜在性原発腫瘍を伴う転移性扁平細胞性頸部癌；多発性内分泌腫瘍症候群；多発性黒色腫／形質細胞腫瘍；菌状息肉腫；骨髄異形成症候群；骨髄異形成／骨髄増殖性疾患；慢性骨髄性白血病；成人急性骨髄性白血病；小児急性骨髄性白血病；多発性硬化症；慢性骨髄増殖性障害；鼻腔副鼻腔癌；鼻咽頭癌；神経芽腫；非ホジキンリンパ腫、妊娠期非ホジキンリンパ腫；口腔癌；口唇口腔癌；口腔咽頭癌；骨肉腫／悪性線維性骨組織球腫；卵巣癌；卵巣上皮癌；卵巣胚細胞腫瘍；卵巣低悪性度潜在性腫瘍；膵臓癌；膵島細胞性膵臓癌；副甲状腺癌；陰茎癌；褐色細胞腫；松果体芽腫およびテント上原始神経外胚葉腫瘍；下垂体腫瘍；形質細胞腫／多発性黒色腫；胸膜肺芽腫；妊娠期乳癌；妊娠期ホジキンリンパ腫；妊娠期非ホジキンリンパ腫；原発性中枢神経系リンパ腫；前立腺癌；直腸癌；腎細胞（腎）癌；腎盂尿管移行上皮細胞癌；網膜芽腫；横紋筋肉腫；唾液腺癌；ユーイング肉腫族の腫瘍；カポジ肉腫；軟組織肉腫；子宮肉腫；セザリー症候群；皮膚癌（非黒色腫性皮膚癌）；皮膚癌；皮膚癌（黒色腫）；メルケル細胞性皮膚癌；小細胞肺癌；小腸癌；軟組織肉腫；扁平細胞癌（皮膚癌（非黒色腫性皮膚癌）を参照されたい）；潜在性原発腫瘍を伴う転移性扁平細胞性頸部癌；胃（Ｇａｓｔｒｉｃ（Ｓｔｏｍａｃｈ））癌；テント上原子神経外胚葉腫瘍；皮膚Ｔ細胞リンパ腫（菌状息肉腫およびセザリー症候群を参照されたい）；精巣癌；胸腺腫；胸腺腫および胸腺癌；甲状腺癌；腎盂尿管移行上皮細胞癌；妊娠性絨毛腫瘍；尿管腎盂移行上皮細胞癌；尿路癌；子宮内膜癌；子宮肉腫；膣癌；視経路視床下部神経膠腫；外陰癌；ワルデンシュトレームマクログロブリン血症；およびウィルムス腫瘍を含む。

【０１９２】

ヌクレオリンを発現することが公知の癌細胞は、肺癌（例えば、非小細胞肺癌）、乳癌、前立腺癌、結腸癌、膵臓癌、腎細胞癌、卵巣癌、白血病（例えば、ＡＭＬ、ＣＬＬ）、メラノーマ、神経膠芽細胞腫、神経芽細胞腫、肉腫および胃癌を含む。さらに、ヌクレオリンを発現する非癌細胞は、樹状細胞、末梢血単球、マクロファージおよびグリア細胞などの免疫細胞ならびに血管平滑筋細胞および内皮細胞を含む。一実施形態において、本発明の抗体は、過免疫疾患および過血管新生疾患（ｈｙｐｅｒ－ａｎｇｉｏｇｅｎｉｃ ｄｉｓｅａｓｅｓ）を有する被験体の治療に使用され、後者は、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許公開番号２００９／０１９１２４４に記載されている。

【０１９３】

ｉ　急性骨髄性白血病

急性骨髄性白血病（ａｃｕｔｅ ｍｙｅｌｏｇｅｎｏｕｓ ｌｅｕｋｅｍｉａ）としても公知である急性骨髄性白血病（ａｃｕｔｅ ｍｙｅｌｏｉｄ ｌｅｕｋｅｍｉａ）（ＡＭＬ）は、血液細胞の骨髄系の癌であり、骨髄に蓄積し、正常な血液細胞の生成に干渉する異常な白血球の急速な成長によって特徴付けられる。ＡＭＬは、成人に影響を与える最も一般的な急性白血病であり、その発生率は年齢と共に増加する。ＡＭＬは比較的希少な疾患であるが、米国において癌死のおよそ１．２％を占め、その発生率は年齢別人口に応じて増加すると予期される。

【０１９４】

ＡＭＬの症状は、正常な骨髄と、赤血球、血小板および正常な白血球の低下を引き起こす白血病細胞との置換によって引き起こされる。これらの症状は、倦怠感、息切れ、アザおよび出血のできやすさおよび感染の危険性の増加を含む。ＡＭＬに関する危険因子のいくつかは特定されているが、疾患の特異的原因は、不明なままである。急性白血病の場合、ＡＭＬの進行は急速であり、治療せずに放置した場合、通常、数週間または数ヶ月以内に死に至る。

【０１９５】

ＡＭＬはいくつかのサブタイプを有し、サブタイプにより治療および予後は変わる。サブタイプに依存し、５年生存率は５～７０％で変動し、再発率は３０～９５％で変動する。ＡＭＬは、始め、寛解の誘導を目的とする化学療法を用いて治療され、患者は、さらな

る化学療法または造血幹細胞移植を受け続けることができる。ＡＭＬの遺伝学に関する最近の研究は、患者がどのくらいの期間生存すると思われるか、および薬剤が有効であるかどうかをよりよく予測する試験が開発されている。

【０１９６】

ＡＭＬの診断に導く最初の症状は、通常特異的ではなく、血球減少症の１種または複数種、例えば、貧血症、好中球減少症および／または血小板減少症に関連する。末梢血における未熟な血液細胞（芽球）を有する異常白血球の過剰（白血球増多症）は共通して見出され、白血病芽球が時として見られるが、ＡＭＬには、血小板、赤血球の孤立した減少が存在し、または白血球数の低下（白血球減少症）もさらに存在する。ＡＭＬの予測診断は、循環白血病芽球が存在する場合、末梢血スメアの検査を介して実施でき、確定診断は、骨髄穿刺および生検から採取した細胞の検査を普通必要とする。

【０１９７】

骨髄または血液は、光学顕微鏡およびフローサイトメトリーを介して検査し、白血病の存在を診断し、白血病の他の型（例えば、急性リンパ芽球性白血病）からＡＭＬを識別し、疾患のサブタイプを分類する（以下を参照されたい）。骨髄または血液の試料は、通常、ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションにおける日常的な細胞遺伝学および蛍光によって、様々な染色体異常に関してもさらに検査される。遺伝的研究は、疾患の結果に影響を与え得る遺伝子、例えば、なかでもＦＬＴ３、ヌクレオホスミンおよびｂｃｒ／ａｂｌの特異的突然変異を探すためにも実施することができる。

【０１９８】

血液および骨髄のスメアに対する細胞化学的染色は、ＡＭＬとＡＬＬとの識別およびＡＭＬの細分類において役立つ。ミエロペルオキシダーゼまたはスダンブラック染色と、非特異的エステラーゼ染色との組合せは、大部分の症例において所望の情報を提供するであろう。ミエロペルオキシダーゼまたはスダンブラックの反応は、ＡＭＬの特定の確立およびＡＬＬとの識別において最も有用である。非特異的エステラーゼ染色は、ＡＭＬにおける単球成分の特定および分化の進んでいない単芽球性白血病とＡＬＬとの識別に使用される。

【０１９９】

ＡＭＬの診断および分類は、資格のある血液病理学者または血液学者によってチャレンジされ得、実施されるべきである。直接的な症例において、特定の形態学的特徴（アウエル小体など）の存在または特異的なフローサイトメトリーの結果により、ＡＭＬと他の白血病とを識別できるが、このような特徴がない場合、診断はより困難であり得る。

【０２００】

広範囲に使用されるＷＨＯ基準によれば、ＡＭＬの診断は、血液および／または骨髄の２０％を超える白血病性骨髄芽球の包含が実証されることによって確立される。ＡＭＬは、治療が異なる、骨髄異形成症候群または骨髄増殖性症候群などの「前白血病」病態との識別に注意を払わなければならない。

【０２０１】

急性前骨髄球性白血病（ＡＰＬ）は、治癒の可能性が最も高く、固有の治療形態を必要とするので、白血病のこのサブタイプの診断を迅速に確立する、または白血病のこのサブタイプを排除することが重要である。血液または骨髄に対して実施されるｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションにおける蛍光は、ＡＰＬを特徴付ける染色体転座（ｔ［１５；１７］）を容易に特定するので、多くの場合この目的に使用される。

【０２０２】

ＡＭＬにおける悪性細胞は骨髄芽球である。正常な造血において、骨髄芽球は骨髄白血球の未熟な前駆体であり、正常な骨髄芽球は、成熟白血球内で徐々に成熟すると思われる。しかし、ＡＭＬにおいて、単一の骨髄芽球は、細胞をその未熟状態に「凍結」し、分化を妨げる遺伝的変化を蓄積する。このような突然変異単独では白血病を引き起こさないが、このような「分化の停止」と、増殖を調節する遺伝子を破壊する他の突然変異とが組み合わされた場合、結果は、ＡＭＬの臨床的実体をもたらす、細胞の未熟なクローンの無調

節な成長である。

【０２０３】

ＡＭＬの多様性および異種性の多さは、白血病性形質転換が分化経路の多くの様々なステップにおいて起こり得るという事実をもたらす。ＡＭＬに関する最新の分類スキームは、白血病細胞（および白血病）の特徴および挙動が、分化が中断された段階に依存し得ることを認識している。

【０２０４】

特異的な細胞遺伝学的異常が、ＡＭＬの多くの患者において見出すことができ、染色体異常の型は、多くの場合、予後的意義を有する。染色体転座は異常な融合タンパク質、通常改変された特性が「分化の停止」を引き起こし得る転写因子をコードする。例えば、急性前骨髄球性白血病において、ｔ（１５；１７）の転座は、いくつかの骨髄特異的遺伝子のプロモーター中のレチノイン酸受容体エレメントと結合し、骨髄の分化を阻害するＰＭＬ－ＲＡＲα融合タンパク質を生み出す。

【０２０５】

ＡＭＬの臨床兆候および症状は、細胞の白血病性クローンが成長した場合、骨髄中の正常な血液細胞の発達に取って代わる、または干渉する傾向があるという事実からもたらされる。これにより、好中球減少症、貧血症および血小板減少症がもたらされる。ＡＭＬの症状は、多くの場合、順にこれらの正常な血液エレメントの数の低下による。希少な症例の場合、緑色腫または骨髄の外側に白血病細胞の固形腫瘍を発症することがあり、その位置に依存して様々な症状を引き起こし得る。

【０２０６】

ＡＭＬの治療は主に化学療法からなり、導入療法および寛解後（または地固め）療法の２相に分けられる。導入療法の目標は、白血病細胞の量を検出不可のレベルまで減少させることによる完全な寛解の達成であり、地固め療法の目標は、任意の残存する検出不可な疾患を除去し、治癒を達成することである。

【０２０７】

Ｍ３を除くすべてのＦＡＢサブタイプは、通常、シタラビン（ａｒａ－Ｃ）およびアントラサイクリン（ダウノルビシンまたはイダルビシンなど）を用いた導入化学療法を受ける。この導入化学療法レジメンは、シタラビンが連続７日間の連続ＩＶ注入として投与され、一方アントラサイクリンはＩＶプッシュとして連続３日間投与されるので「７＋３」（または「３＋７」）として公知である。患者の７０％までがこのプロトコールにより寛解に達している。高用量のシタラビン単独または治験薬を含む他の代替の導入レジメンもまた使用できる。骨髄抑制および感染の危険性の増加を含む療法の毒性作用のため、導入化学療法は高齢者には実施できず、任意の選択肢は、より穏やかな化学療法または緩和ケアを含み得る。

【０２０８】

急性前骨髄球性白血病としても公知であるＡＭＬのＭ３サブタイプは、導入化学療法に加え、薬剤ＡＴＲＡ（オールトランスレチノイン酸）を用いてほぼ普遍的に治療される。ケアは、播種性血管内凝固（ＤＩＣ）を防ぐように用いなければならず、前骨髄球がそれらの顆粒内容物を末梢循環に放出した場合、ＡＰＬの治療を合併させる。ＡＰＬは、文書で十分に立証された治療プロトコールを用いて大いに治癒可能である。

【０２０９】

導入相の目標は、完全な寛解に達することである。完全な寛解とは、疾患が治癒することを意味するものではなく、むしろ、利用可能な診断方法により疾患が検出できないことを表す。完全な寛解は、新たに診断された成人の約５０％～７５％において得られるが、これは上記の予後因子に基づいて変動し得る。寛解の長さは、元々の白血病の予後の特徴に依存する。一般的に、すべての寛解は、さらなる地固め療法を用いなければ失敗すると思われる。

【０２１０】

完全な寛解が達成された後でさえ、白血病細胞は、小さすぎて現在の診断技術では検出

できない数で残存すると思われる。さらに寛解後療法または地固め療法を行わなかった場合、ほぼすべての患者が最終的には再発するであろう。したがって、検出不可な疾患を排除し再発を防ぐため、すなわち、治癒を得るために、さらなる療法が必要である。

【０２１１】

寛解後療法の特定の型は、患者の予後因子（上を参照されたい）および全体的な健康に基づき、個別に行われる。予後良好な白血病（すなわち、ｉｎｖ（１６）、ｔ（８；２１）およびｔ（１５；１７））に関して、患者は、通常、地固め化学療法として公知の強化化学療法のさらなる３～５クールを受けるものと思われる。再発の危険性が高い患者（例えば、危険性の高い細胞遺伝学、根本的なＭＤＳまたは療法関連ＡＭＬを有する患者）に関して、患者が移植に耐えることができ、適切なドナーを有する場合、通常同種幹細胞移植が推奨される。危険性が中程度のＡＭＬのための最も優れた寛解後療法（正常な細胞遺伝学または細胞遺伝学の変化が予後良好群または危険性の高い群に分けられない）は明確ではなく、患者の年齢および全体的健康、患者の個人的価値および適切な幹細胞ドナーが利用可能かどうかを含む、特定の状況に依存する。

【０２１２】

しかし、積極的療法にもかかわらず、長期無病生存を楽しく過ごすのはわずか２０％～３０％の患者である。再発したＡＭＬを有する患者に関して、患者がまだ受けたことがない場合、唯一の実証済みの、可能性のある治癒的療法は幹細胞移植である。２０００年に、モノクローナル抗体連結細胞毒性薬のゲムツズマブ・オゾガマイシン（Ｍｙｌｏｔａｒｇ）が、高用量化学療法の候補ではない、再発ＡＭＬを有する６０歳を超える患者用に、米国において承認された。

【０２１３】

幹細胞移植の候補ではない再発ＡＭＬを有する患者、または幹細胞移植後に再発した患者は、従来の治療の任意の選択肢が限られるので、臨床試験において治療を提供され得る。研究中の薬剤は、クロファラビンなどの細胞毒性薬ならびにファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、デシタビンおよびＭＤＲ１（多剤耐性タンパク質）の阻害剤などの標的療法を含む。再発ＡＭＬのための治療の任意選択肢は非常に限られるので、提供できる別の任意選択肢は緩和ケアである。

【０２１４】

再発急性前骨髄球性白血病（ＡＰＬ）のために、試験において三酸化砒素が試験され、食品医薬品局において承認されている。ＡＴＲＡのように、三酸化砒素はＡＭＬの他のサブタイプには作用しない。

【０２１５】

急性骨髄性白血病は治癒可能な疾患であり、特定の患者に関する治癒の機会は、多くの予後因子に依存する。ＡＭＬにおける単一の最も重要な予後因子は、細胞遺伝学、または白血病細胞の染色体構造である。ある細胞遺伝学的異常は、非常に良い転帰と関連する（例えば、急性前骨髄球性白血病におけるｔ（１５；１７）転座）。ＡＭＬ患者の約半数は、「正常」な細胞遺伝学を有し、それらは中間の危険性の群に分けられる。他の細胞遺伝学的異常の多くは、予後不良および治療後の再発の危険性と関連することが公知である。

【０２１６】

既存の骨髄異形成症候群または骨髄増殖性疾患から起こるＡＭＬ（いわゆる２次性ＡＭＬ）は、予後がより悪く、別の以前の悪性腫瘍に対する化学療法後に起きた治療関連ＡＭＬも予後がより悪い。これらの実体の両方が、好ましくない細胞遺伝学的異常と高い率で関連する。

【０２１７】

いくつかの研究において、６０歳を超えた年齢および乳酸デヒドロゲナーゼレベルの上昇もまた転帰の不良と関連する。癌の大部分の型と同様に、活動指標（すなわち、全身健康状態および患者の活動レベル）は、同様に予後において主要な役割を果たす。

【０２１８】

ＦＬＴ３遺伝子内縦列重複（ＩＴＤ）は、ＡＭＬにおいて予後不良をもたらすことが示

されている。より積極的な療法によるこれらの患者の治療、例えば最初の寛解における幹細胞移植が長期生存を強化することは示されておらず、したがってこの時点ではこの予後特徴の臨床的意義は不確実である。ＦＬＴ３のＩＴＤは白血球停滞と関連し得る。

【０２１９】

研究者は、ＡＭＬにおけるｃ－ＫＩＴ突然変異の臨床的意義を調査している。これらは広く行き渡り、ｃ－ＫＩＴの活性を薬理学的に遮断できる、イマチニブおよびスニチニブなどのチロシンキナーゼ阻害剤が利用できるため、臨床的に関連がある。予後因子または治療標的として調査される他の遺伝子は、ＣＥＢＰＡ、ＢＡＡＬＣ、ＥＲＧおよびＮＰＭ１を含む。

【０２２０】

臨床試験における治癒率は２０～４５％の範囲であるが、臨床試験は多くの場合若い患者および積極的な療法に耐えられ得る患者のみを含むことに留意すべきである。ＡＭＬを有するすべての患者（高齢者および積極的な療法に耐えられない患者を含む）に関する全体の治癒率は、もっと低いと思われる。前骨髄球性白血病に関する治癒率は、９８％ほどであり得る。

【０２２１】

ｉｉ　慢性リンパ球性白血病

慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）としても公知のＢ細胞慢性リンパ球性白血病（Ｂ－ＣＬＬ）は、白血病の最も一般的な型である。白血病は、白血球（白血球（ｌｅｕｋｏｃｙｔｅｓ））の異常な悪性新生物の増殖である。ＣＬＬは、Ｂ細胞と呼ばれるリンパ球である、白血球の特定のサブタイプに関連する。Ｂ細胞は骨髄を起源とし、リンパ節において発達し、通常は感染症と闘う。ＣＬＬにおいて、Ｂ細胞のＤＮＡは損傷し、抗体の生成によって感染症と闘うことができない。さらに、それらは調節不能に成長し、骨髄および血液内に蓄積し、正常な血液細胞を締め出す。

【０２２２】

ＣＬＬは成人の疾患であるが、希少な症例において１０代および時として小児（遺伝性）にも発症することがある。ＣＬＬと新たに診断された人々の大部分（＞７５％）は、年齢が５０を超えており、大半は男性である。大部分の人々は、高い白血球数を報告する日常の血液検査の結果として、症状がなく診断されるが、進行した場合、ＣＬＬは、リンパ節、脾臓および肝臓の腫れおよび最終的には貧血症および感染症をもたらす。早期ＣＬＬは治療されず、後期ＣＬＬは化学療法およびモノクローナル抗体により治療される。生存は、５年から２５年を超えて変動する。現在は、ＤＮＡの突然変異を検査することによって生存の長さをより正確に予測でき、緩慢に進行する疾患を有する患者を安心させることができ、生涯治療を必要としないこともあり得る。

【０２２３】

当初は理解されていなかったが、ＣＬＬは、主にリンパ節に存在する非ホジキンリンパ腫の型である、小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）と呼ばれる疾患と同一でないかと現在思われている。世界保健機関は、ＣＬＬおよびＳＬＬは１つの疾患の異なる段階であり、２つの別々の実体ではないと考えている。

【０２２４】

ステージ分類、疾患の程度の決定は、Ｒａｉステージ分類システムまたはＢｉｎｅｔ分類を用いて実施され、主に血小板または赤血球の数の低下が存在するか否かに基づく。早期ステージの疾患は治療の必要はない。

【０２２５】

最近の論文は、ＣＬＬの２つまたは３つの予後群は、細胞の成熟状態に基づいて存在することを示唆している。この識別は、免疫グロブリン可変領域重鎖（$IgV_H$）遺伝子の突然変異状態によって判別されるリンパ球の成熟度に基づく。危険性の高い患者は、$IgV_H$抗体遺伝子領域中のＤＮＡにおいていくつかの突然変異を有する未熟な細胞パターンを有するが、一方、危険性の低い患者は、成熟リンパ球を示す抗体遺伝子領域中のＤＮＡの多量の突然変異を示す。

【０２２６】
ＩｇＶ$_H$抗体ＤＮＡの変化の評価を実施することは困難であるので、表面抗原分類３８（ＣＤ３８）またはＺ鎖関連タンパク質キナーゼ－７０（ＺＡＰ－７０）のどちらかの存在を、ＣＬＬの危険性の高いサブタイプの代用マーカーにできる。それらの発現は、より未熟な細胞状態およびより急速な疾患経過と相関する。
【０２２７】
成熟状態に加えて、ＣＬＬを有する患者の予後は、新生細胞集団内の遺伝的変化に依存する。これらの遺伝的変化は、蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）と称される技術を使用して、染色体部分に対する蛍光プローブによって特定できる。疾患挙動に関して強い影響を有する４種の主要な遺伝的異常が、ＣＬＬ細胞において認識されている。
【０２２８】
細胞周期制御タンパク質ｐ５３を標的とする第１７染色体の短腕部分の欠失（ｄｅｌ　１７ｐ）は、特に有害である。この異常を有する患者は、治療を必要とするまでの間隔が有意に短く、生存も短い。この異常は、ＣＬＬを有する患者の５～１０％に見出される。第１１染色体の長腕の欠失（ｄｅｌ　１１ｑ）もまた、ｄｅｌ　１７ｐに見られる程度ほどではないが、望ましくない。この異常はＡＴＭ遺伝子を標的とし、ＣＬＬにおいて稀に起こる（５～１０％）。追加の第１２染色体である１２トリソミーは、比較的頻繁に見出され、患者の２０～２５％において起こり、中間の予後をもたらす。第１３染色体の長腕の欠失（ｄｅｌ　１３ｑ）はＣＬＬにおいて最も一般的な異常であり、この欠損を含有する細胞を有する患者の大体５０％に存在する。これらの患者は、最も良好な予後を示し、大部分が、治療の必要なく長年、数十年でも生存すると思われる。この欠失によって標的とされる遺伝子は、死を阻害する重要な遺伝子産物の発現に影響を与える、低分子阻害性ＲＮＡ分子を生成すると思われるセグメントである。
【０２２９】
大部分の人々は、高い白血球数を報告する日常の血液検査の結果として、症状がなく診断される。一般的でないが、ＣＬＬは、高い白血球数はなく、または血液中に疾患の証拠がなく、リンパ節の腫脹として存在する。これは、小リンパ球性リンパ腫と称される。一部の個人において、この疾患は、新生細胞が骨髄を圧倒し、倦怠感または衰弱を生じる貧血症をもたらした後にのみ明らかになる。
【０２３０】
この疾患は容易に診断される。ＣＬＬは、普通、全血球計算値（ＣＢＣ）検査において、白血球の１種の増加であるリンパ球増加症の存在によって、最初に疑われる。これは、高い頻度で、日常の医師の受診における偶発的所見である。ほとんどの場合、リンパ球数は４０００細胞／ｍｍ$^3$（マイクロリットル）血液を超えるが、それよりはるかに高い場合もある。高齢の個人におけるリンパ球増加症存在は、ＣＬＬに対する強い疑念を提起するはずであり、臨床的に不要でない限り、確認診断試験、特にフローサイトメトリーを実施するべきである。
【０２３１】
ＣＬＬの診断は、細胞表面において普通ではないが特徴的な分子パターンを示す、血液、骨髄または組織中のＢリンパ球の異常な集団の実証に基づく。この非定型の分子パターンは、細胞表面マーカーの表面抗原分類５（ＣＤ５）および表面抗原分類２３（ＣＤ２３）の同時発現を含む。さらに、一個人内のすべてのＣＬＬ細胞は、遺伝学的に同一のクローン細胞である。実際に、これは、異常なＢ細胞の全体集団において、相互に排他的な抗体軽鎖のカッパまたはラムダのうち１種だけの検出によって推察される。正常なＢリンパ球は、カッパ発現細胞およびラムダ発現細胞両方の混合物をもたらす、様々な抗体生成細胞のごたまぜからなる。カッパ生成Ｂ細胞およびラムダ生成Ｂ細胞の正常な分布を欠くことは、クローン性を実証する１つの根拠であり、任意のＢ細胞悪性腫瘍（Ｂ細胞非ホジキンリンパ腫）の診断を確立する鍵となる要素である。
【０２３２】

クローン性およびマーカー分子の発現を確認するための、末梢血の顕微鏡検査およびフローサイトメトリーによるリンパ球の分析の組合せは、ＣＬＬの診断を確立するために必要である。両方とも少量の血液で容易に達成される。フローサイトメーターは、体液中の個別細胞についての分子の発現を検査できる機器である。これは、機器により認識される蛍光タグを含むマーカー分子に対する、特異的抗体の使用を必要とする。ＣＬＬにおいて、リンパ球は、一般的にクローン性であり、Ｂ細胞系統のリンパ球であり（発現マーカー分子の表面抗原分類１９（ＣＤ１９）およびＣＤ２０）、マーカー分子のＣＤ５およびＣＤ２３を特徴的に発現する。形態学的に、顕微鏡下で細胞は正常なリンパ球と似ているが、わずかに小さく、壊れやすく、スライドグラスに塗布したときに、多数の破壊された細胞（破損細胞）を生じる。

【０２３３】

ＣＬＬの治療は、完全な治癒よりむしろ、疾患およびその症状の管理に焦点を合わせる。ＣＬＬは、化学療法、放射線療法、生物学的療法または骨髄移植によって治療される。症状は、時として外科的に（腫脹した脾臓の脾臓摘出）または放射線療法（腫脹したリンパ節の「減量」）によって治療される。

【０２３４】

ＣＬＬの初期治療は、正確な診断および疾患の進行さらに医療関係者の優先および経験に依存して変わる。ＣＬＬ療法に使用される薬剤は多数存在し、それらを個別に、または相互に組み合わせて研究する、相当数の調査活動が存在する。

【０２３５】

一般的に治癒可能と考えられるが、ＣＬＬは多くの場合緩慢に進行する。ＣＬＬを有する多くの人々は、長年、いくつかの場合数十年の間正常かつ活動的な生活を送る。その緩慢な発症のため、早期ＣＬＬの医療介入は生存時間または生活の質を改善しないと考えられるので、早期ステージのＣＬＬは一般的に治療されない。その代わりに、病態は継時的にモニターされ、疾患パターンの任意の変化が検出される。

【０２３６】

患者の臨床的症状または血球数が、疾患が患者の生活の質に影響を与え得る時点まで進行したことを示したときに、ＣＬＬの治療を開始する決断がなされる。いつ治療を開始するか、およびどの手段によるかの決定は多くの場合困難であり、研究により、早すぎる疾患治療に延命効果はないことが示されている。国立がん研究所のワーキンググループは、治療を始める前に満たされるべき特異的なマーカーを用いた、治療に関するガイドラインを発行した。

【０２３７】

一次療法の場合、プリン類似体のフルダリビンがクロラムブシルより優れた奏効率をもたらすことが示されたが、フルダラビンの早期使用が全生存を改善するという証拠はなく、一部の臨床医は再発した疾患用にフルダラビンをとっておくことを好む。Ｍａｂ療法は、アレムツズマブ（ＣＤ５２に対する）およびリツキシマブ（ＣＤ２０に対する）を含む。

【０２３８】

併用化学療法の選択肢は、新たに診断されたＣＬＬおよび再発したＣＬＬの両方において有効である。近年、無作為化試験により、プリン類似体（フルダラビン）とアルカリ化剤（シクロホスファミド）との併用が、単一の薬剤より高い奏効率および長期の無進行生存を生み出すことが示された：

ＦＣ（フルダラビンおよびシクロホスファミド）

ＦＲ（フルダラビンおよびリツキシマブ）

ＦＣＲ（フルダラビン、シクロホスファミドおよびリツキシマブ）

ＣＨＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾロン）

同種異系の骨髄（幹細胞）移植は、その危険性により、ＣＬＬの第１選択治療として使用されることは稀である。骨髄非破壊的同種異系幹細胞移植の使用に対する興味が増大し

ており、これは、適切なドナーを有する選択された患者に治癒の見込みを提供する。

【０２３９】

最近の研究は、どの患者が最も良い候補であるか、および様々な状況においてどの取組みが最も優れているかを決定するために、骨髄移植の様々な形態を比較している。ＣＬＬによる死の危険性が高い若い患者は、造血幹細胞移植（ＨＳＣＴ）が考えられる。患者自身の血液細胞を使用する危険性の低い治療形態である自己幹細胞移植は、治療法ではない。健康なドナー由来の血液細胞を使用する危険性の高い、同種異系幹細胞移植の骨髄機能廃絶（骨髄を殺す）形態は、一部の患者にとって治療法であり得るが、大部分の患者は治療に耐えられない。骨髄非破壊的前処置同種異系幹細胞移植と呼ばれる中間のレベルは、高齢または虚弱な患者にも十分耐えられ得る。

【０２４０】

「難治性」ＣＬＬは、もはや治療に順調に応答しない疾患である。この場合、レナリドマイド、フラボピリドールおよび骨髄（幹細胞）移植を含むより積極的な療法が考えられる。モノクローナル抗体、アレムツズマブ（ＣＤ５２に対する）が、難治性の骨髄系疾患を有する患者に使用できる。

【０２４１】

ｉｉｉ　乳癌

乳癌は、乳房、通常、乳管または小葉の内膜において発生する癌である。様々なステージ（伸展）、悪性度および遺伝子構造の、様々な型の乳癌がある。最良の治療により、１０年無病生存率は９８％～１０％に変動する。治療は、外科手術、薬剤（化学療法）および放射線治療から選択される。米国において、２００４年には２１６，０００例の侵襲性乳癌があり、４０，０００例が死亡した。世界的に、乳癌は、肺癌に次いで第２位の最も一般的な癌の型であり（全癌発症の１０．４％、両方の性別において計算）、癌死の第５位の一般的原因である。２００４年において、世界中で乳癌により５１９，０００例が死亡した（癌死の７％；全死亡のおよそ１％）。乳癌は、女性において男性の約１００倍の頻度であるが、生存率は両方の性別で等しい。

【０２４２】

乳癌の初期症状または自覚的兆候は、通常、周囲の乳房組織と異なると感じるしこりである。Ｍｅｒｃｋ　Ｍａｎｕａｌによれば、女性がしこりを感じた場合、８０％を超える乳癌の症例が発見される。米国がん協会によれば、医師により検出される乳癌の最初の医学的兆候または客観的目安は、マンモグラムにより発見される。腋下に位置するリンパ節において見出されるしこりもまた、乳癌を示す可能性がある。しこり以外の乳癌の指標は、乳房のサイズもしくは形状、皮膚のえくぼ症状、乳首の内反または片側の乳首からの自発的分泌を含み得る。痛み（「乳房痛」）は、乳癌の有無の決定において信頼できないツールであるが、他の乳房の健康問題を暗示し得る。

【０２４３】

乳癌細胞が、皮膚リンパ管、乳房の皮膚中の小型のリンパ管に浸潤した場合、その症状は皮膚の炎症と似ており、したがって炎症性乳癌（ＩＢＣ）として公知である。炎症性乳癌の症状は、乳房の痛み、腫れ、温感および赤みならびに「橙皮状皮膚」と称されるオレンジの皮のような皮膚のきめを含む。乳癌の別の症状群の報告は、乳房のページット病である。この症候群は、湿疹様の皮膚変化、例えば、乳首の皮膚の赤みおよび軽度の薄利として表れる。ページェット病の進展として、症状は、うずき、かゆみ、感度の増加、灼熱感および痛みを含み得る。乳首からの分泌もまたあり得る。ページェット病と診断された女性のおよそ半数が、乳房にしこりを有する。

【０２４４】

時折、乳癌は転移性疾患、すなわち元の器官を超えて伸展する癌として存在する。転移性乳癌は、転移の位置に依存した症状を起こす。転移の一般的な部位は、骨、肝臓、肺および脳を含む。説明の付かない体重減少は、時として潜在性乳癌を告知していることがあり、熱または冷えの症状も癌を告知し得る。骨または関節の痛みは、時折、転移性乳癌の兆候であり得、黄疸または神経系の症状もまた、転移性乳癌の兆候であり得る。これらの

症状は「非特異的」であり、それらは他の多くの疾病の兆候でもあり得る。

【０２４５】

特定されている第１危険因子は性別、年齢、出産、ホルモン、高脂肪食、アルコール摂取、肥満ならびに環境因子、例えばタバコの使用、放射線および交代勤務などである。乳癌症例の９５％に関しては病因学で公知ではないが、新たな乳癌のおよそ５％は、遺伝性症候群に寄与する。特に、乳癌感受性遺伝子ＢＲＣＡ１およびＢＲＣＡ２のキャリアは、乳癌および卵巣癌に関する危険因子の増加が３０～４０％であり、突然変異が起こったタンパク質部分に依存する。専門家は、遺伝的乳癌の９５％は、これらの２つの遺伝子の１つに由来し得ると考えている。遺伝性乳癌は、部位特異的遺伝性乳癌、乳房単独、または乳房－卵巣に影響を与える癌および他の癌症候群の形態をとり得る。乳癌は、女性および男性の親族どちらからも遺伝し得る。

【０２４６】

乳癌のサブタイプは、免疫組織化学的根拠において分類できる。サブタイプの定義は一般的に以下のようである：

正常（ＥＲ＋、ＰＲ＋、ＨＥＲ２＋、サイトケラチン５／６＋およびＨＥＲ１＋）

ルミナール（ｌｕｍｉｎａｌ）Ａ（ＥＲ＋および／またはＰＲ＋、ＨＥＲ２－）

ルミナールＢ（ＥＲ＋および／またはＰＲ＋、ＨＥＲ２＋）

トリプルネガティブ（ＥＲ－、ＰＲ－、ＨＥＲ２－）

ＨＥＲ２＋／ＥＲ－（ＥＲ－、ＰＲ－およびＨＥＲ２＋）

未分類（ＥＲ－、ＰＲ－、ＨＥＲ２－、サイトケラチン５／６－およびＨＥＲ１－）

トリプルネガティブ乳癌細胞の場合、癌の成長は、エストロゲンもしくはプロゲステロンによって、またはＨＥＲ２タンパク質に由来する成長シグナルによって駆動されない。同じ証拠により、このような癌細胞は、タモキシフェロンもしくはアロマターゼ阻害剤などのホルモン療法またはＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）などのＨＥＲ２受容体を標的とする療法には応答しない。乳癌の約１０～２０％は、トリプルネガティブであることが見出される。成功しそうにない療法のコストおよび毒性作用を避けるため、およびトリプルネガティブ乳癌の治療に使用できる治療に集中するために、これらの型の癌を特定することが重要である。乳癌の他の型と同様に、トリプルネガティブ乳癌は、外科手術、放射線療法および／または化学療法を用いて治療できる。ある特に有望な取組みは、「ネオアジュバント」療法であり、外科手術前に化学療法および／または放射線療法を提供する。別の新しい薬剤療法は、ポリ（ＡＤＰ－リボース）ポリメラーゼまたはＰＡＲＰ阻害剤の使用である。

【０２４７】

上述のスクリーニング技術は、癌の可能性の決定において有用であるが、スクリーニングで検出されたしこりが、単純嚢胞などの良性の代替物に対して、癌であるかどうかを確認するために、さらなる試験が必要である。臨床状況において、乳癌は、一般的に、臨床的乳房検査（訓練を受けた医師による乳房検査）、マンモグラフィーおよび穿刺吸引細胞診の「トリプルテスト」を使用して診断される。スクリーニングにも使用されるマンモグラフィーおよび臨床的乳房検査の両方は、しこりが癌であるおよその可能性を示すことができ、任意の他の病巣を特定することもできる。穿刺吸引細胞診（Ｆｉｎｅ　Ｎｅｅｄｌｅ　Ａｓｐｉｒａｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ｃｙｔｏｌｏｇｙ）（ＦＮＡＣ）は、必要に応じて局所麻酔剤を使用してＧＰの診療所において受けることができ、しこり由来の体液のごく一部を抽出する試みを伴う。澄んだ体液は、しこりが癌性である可能性はほぼないが、血の混じった体液は、癌性細胞に関する顕微鏡下の調査に送られることになる。総合すると、これらの３種のツールは、精度の高い乳癌の診断に使用できる。生検の他の選択肢は、乳房のしこりの一部を除去するコア生検およびしこり全体を除去する切除生検を含む。

【０２４８】

乳癌のスクリーニングは、別の健康な個人において癌を見つけるための試みである。女性のための最も一般的なスクリーニング方法は、Ｘ線マンモグラフィーおよび臨床的乳房検査の併用である。正常な危険性より高い女性、例えば癌の強い家族歴を有する女性にお

いて、さらなるツールとして、遺伝学的検査または乳房磁気共鳴画像法を挙げることができる。

【０２４９】

乳房の自己検査は過去に非常に支持されたスクリーニングの形態であるが、いくつかの大規模な研究が、女性にとって自己検査には延命効果がなく、多くの場合著しい不安を引き起こすことを示したので、その後不評を招いた。このことは、検出できる癌は、すでに比較的進んだステージの癌であることが多いのに対して、他の方法は、治癒的治療がより多く可能である早期ステージにおいて癌を特定することを推奨しているという理由であると考えられる。

【０２５０】

Ｘ線マンモグラフィーは、Ｘ線を使用して、任意の特徴的でない塊またはしこりに関して検査する。定期的なマンモグラムが、いくつかの国において特定の年齢を超えた女性のスクリーニングツールとして推奨されている。

【０２５１】

乳癌の遺伝学的検査は、通常ＢＲＣＡ遺伝子における突然変異の検査を伴う。これは乳癌の危険性が上がった人々を除いて、一般的に推奨される技術ではない。

【０２５２】

乳癌治療の主力は、腫瘍が局在する場合、可能性のあるアジュバントホルモン療法（タモキシフェンまたはアロマターゼ阻害剤と一緒に）、化学療法および／または放射線療法と一緒の外科手術である。現在、外科手術（アジュバント療法）後の治療の推奨は、パターンに従う。患者の臨床的基準（年齢、癌の型、サイズ、転移）に依存して、治療の様々な規則に従った個々の危険性の分類を用いて、患者は危険性の高い患者および危険性の低い患者に大まかに分けられる。治療の可能性は、放射線療法、化学療法、ホルモン療法および免疫療法を含む。

【０２５３】

標的癌療法は、癌細胞の特定の特徴、例えば、癌細胞を急速に、または異常な方法で成長させるタンパク質を標的とする治療である。標的療法は、一般的に化学療法よりも正常な健康細胞に害を与える可能性が低い。いくつかの標的療法は、本発明者の免疫系によって天然に生成される抗体のように作用する抗体である。標的療法のこれらの型は、時として免疫標的療法と呼ばれる。

【０２５４】

現在、医師が乳癌の治療に使用する３種の標的療法がある。Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）（トラスツズマブ）は、細胞に成長するように伝える化学信号を受け取る、癌細胞の能力を遮断することによって、ＨＥＲ２－陽性乳癌に対して作用する。Ｔｙｋｅｒｂ（登録商標）（ラパチニブ）は、調節不能な細胞成長を引き起こすことができる特定のタンパク質を遮断することによって、ＨＥＲ２陽性乳癌に対して作用する。Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）（ベバシズマブ）は、癌細胞が成長および機能するために依存する、新しい血管の成長を遮断することによって作用する。

【０２５５】

ホルモン（抗エストロゲン）療法は、ホルモン受容体陽性乳癌に対して、２種の方法：第１に、体内のホルモンエストロゲンの量を低下させることによって、第２に、体内のエストロゲンの作用を遮断することによって作用する。女性の体内においてエストロゲンの大部分は卵巣によって作られる。エストロゲンは、ホルモン受容体陽性乳癌を成長させる。それ故、エストロゲンの量を低下させること、またはその作用を遮断することは、ホルモン受容体陽性乳癌を縮小させることに役立ち、ホルモン受容体陽性乳癌が再び起きる（再発）危険性を低下させ得る。ホルモン療法の医薬品は、ホルモン受容体陰性乳癌に対しては有効ではない。ホルモン療法の医薬品にはいくつかの型があり、アロマターゼ阻害剤、選択的エストロゲン受容体調節因子およびエストロゲン受容体下方制御因子を含む。いくつかの症例において、ホルモン受容体陽性乳癌を治療するために、または乳癌の危険性が非常に高い女性の予防対策として、卵巣および卵管を外科的に除去することができる。

卵巣は、薬物を使用して一時的に閉鎖することもできる。

【０２５６】

治療の計画において、医師は、遺伝子発現に基づく、乳癌再発の危険性を予測するオンコタイプ（Ｏｎｃｏｔｙｐｅ）ＤＸまたはマイクロアレイ試験などのＰＣＲ試験を使用することもできる。２００７年２月に、最初の乳癌予測試験が、食品医薬品局から正式な承認を得た。これは、早期ステージの乳癌を有する女性が、５または１０年以内に再発するかどうかを予測するために役立つ新しい遺伝子試験であり、これは、初発腫瘍をどの程度積極的に治療するかの感化に役立ち得る。

【０２５７】

放射線療法は、外科手術後に残存し得る癌細胞の破壊を助けるためにも使用できる。放射線は、正確な線量で送達された場合、再発の危険性を５０～６６％減少できる。

【０２５８】

Ｅ．併用療法

単一の薬剤に対する腫瘍細胞の耐性は、臨床腫瘍学において重要な問題を提示する。現在の癌研究の１つの目標は、既存の療法の有効性を改善する方法を見出すことである。１つの方法は療法を組み合わせることであり、併用療法として公知である。一実施形態において、本発明は、抗ヌクレオリン抗体および、「標的細胞」を接触させるステップに使用するための組成物を含む、少なくとも１種の他の薬剤を組み合わせる併用療法を提供する。一態様において、抗ヌクレオリン抗体および少なくとも１種の他の薬剤の併用は、細胞を殺す、または細胞の増殖を阻害するための併用有効量で使用される。

【０２５９】

一実施形態において、本方法は、細胞と、ヒト抗ヌクレオリン抗体および１種または複数種のさらなる薬剤または因子とを接触させるステップをさらに含むことができる。一実施形態において、本方法は、細胞と、両方の薬剤を含む単一の組成物または薬理学的製剤とを接触させるステップ、または細胞と、一方の組成物が抗ヌクレオリン抗体を含み、他方が薬剤を含む、２種の異なる組成物もしくは製剤とを同時に接触させるステップをさらに含む。

【０２６０】

別の実施形態において、本方法は、他の薬剤による接触の前後の、数分から数週間の範囲の間隔の、抗ヌクレオリン抗体による接触を含む。他の薬剤および抗ヌクレオリン抗体が別々に細胞に適用される実施形態において、個々の送達時間の間は、薬剤および抗ヌクレオリン抗体がまだ細胞において有利に併用効果を発揮できるように、長期間失効しなかったことを一般的に確実にした。このような場合、細胞と、互いに約１２～２４時間、より好ましくは互いに約６～１２時間以内に両方の様式で接触させることを企図し、遅延時間は約１２時間だけが最も好ましい。いくつかの状況において、治療期間を有意に延長することが望ましいことがあるが、それぞれの投与の間は数日（２、３、４、５、６または７）から数週間（１、２、３、４、５、６、７または８）で無効となる。

【０２６１】

別の実施形態において、本方法は、抗ヌクレオリン抗体または他の薬剤のいずれかを複数回投与するステップを含む。抗ヌクレオリン抗体または他の薬剤の併用は、抗ヌクレオリン抗体を「Ａ」および他の薬剤を「Ｂ」とした場合、以下のような例示を含む：

Ａ／Ｂ／Ａ　Ｂ／Ａ／Ｂ　Ｂ／Ｂ／Ａ　Ａ／Ａ／Ｂ　Ｂ／Ａ／Ａ　Ａ／Ｂ／Ｂ　Ｂ／Ｂ／Ｂ／Ａ　Ｂ／Ｂ／Ａ／Ｂ　Ａ／Ａ／Ｂ／Ｂ　Ａ／Ｂ／Ａ／Ｂ　Ａ／Ｂ／Ｂ／Ａ　Ｂ／Ｂ／Ａ／Ａ　Ｂ／Ａ／Ｂ／Ａ　Ｂ／Ａ／Ａ／Ｂ　Ｂ／Ｂ／Ｂ／Ａ　Ａ／Ａ／Ａ／Ｂ　Ｂ／Ａ／Ａ／Ａ　Ａ／Ｂ／Ａ／Ａ　Ａ／Ａ／Ｂ／Ａ　Ａ／Ｂ／Ｂ／Ｂ　Ｂ／Ａ／Ｂ／Ｂ　Ｂ／Ｂ／Ａ／Ｂ。

【０２６２】

他の併用も企図される。この場合も先と同様に、細胞を殺すことを達成するために、両方の薬剤は、細胞を殺すために有効な併用量で細胞に送達される。

【０２６３】

併用療法における使用に適切な薬剤または因子は、細胞に適用した場合、ＤＮＡの損傷を誘導する任意の化合物または治療である。特に、このような薬剤は、上記のＶＩ項（Ｃ）（ｉ）～（ｉｉｉ）において述べた薬剤である。本発明による癌の治療において、腫瘍細胞と、抗ヌクレオリン抗体に加えて薬剤と接触させる。このことは、局所腫瘍部位に放射線を照射する、または被験体に、化学療法用化合物を含む治療有効量の医薬組成物を投与することによって達成できる。

【０２６４】

「化学療法薬」ともいわれる様々な化合物が、ＤＮＡの損傷を誘導するために機能し、それらのすべては本明細書に開示の併用治療方法への使用を意図される。一実施形態において、「他の薬剤」は化学療法薬を含む。本発明の化学療法薬のカテゴリーは、限定するものではないが、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞骨格破壊剤、エポチロン、トポイソメラーゼＩＩ阻害剤、ヌクレオチド類似体および前駆体類似体、ペプチド抗生物質、白金ベースの薬剤、レチノイドまたはビンカアルカロイドおよび誘導体を含む。これらの群内の特定の化学療法薬は、限定するものではないが、アクチノマイシン－Ｄ、ａｌｌ－ｔｒａｎｓレチノイン酸、アザシチジン、アドリアマイシン、アザチオプリン、ブレオマイシン、カンプトテシン、カルボプラチン、カペシタビン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エポチロン、エトポシド、フルオロウラシル、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、過酸化水素、イダルビシン、イマチニブ、メクロレタミン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシンＣ、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、バルルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビンを含む。本発明は、放射線に基づいていても、または実際の化合物であっても、１種または複数種のＤＮＡ損傷剤の組合せの使用、例えば、Ｘ線およびシスプラチンの使用またはシスプラチンおよびエトポシドの使用をさらに包含する。

【０２６５】

核酸、特にＤＮＡと直接架橋する薬剤が、ＤＮＡの損傷を容易にし、抗ヌクレオリン抗体との相乗的な、抗新生物薬の併用をもたらすと予想されている。シスプラチンなどの薬剤および他のＤＮＡアルキル化剤が使用できる。シスプラチンは、癌の治療に広く使用されており、臨床適用は、３週間毎に２０ｍｇ／ｍ$^2$で５日間、合計３クールの有効用量で使用される。シスプラチンは、経口的には吸収されず、したがって静脈内、皮下、腫瘍内または腹腔内への注入を介して送達されなければならない。

【０２６６】

ＤＮＡを損傷する薬剤は、ＤＮＡの複製、有糸分裂および染色体分離に干渉する化合物をさらに含む。このような化学療法化合物は、ドキソルビシンとしても公知のアドリアマイシン、エトポシド、ベラパミル、ポドフィロトキシンなどを含む。新生物の治療のための臨床状況において広く使用される、これらの化合物は、アドリアマイシンに関しては２５～７５ｍｇ／ｍ$^2$の範囲の用量を２１日間隔で静脈内ボーラス注入を介して、エトポシドに関しては３５～５０ｍｇ／ｍ$^2$を静脈内に、または静脈内用量の２倍を経口的に投与される。

【０２６７】

核酸前駆体およびサブユニットの合成および忠実性を破壊する薬剤もまた、ＤＮＡの損傷をもたらす。したがって、多数の核酸前駆体が開発されている。特に有用なものは、広範囲な試験を受け、容易に利用可能な薬剤である。したがって、５フルオロウラシル（５－ＦＵ）などの薬剤は、新生物組織に優先的に使用され、この薬剤は新生細胞への標的化に特に有用となっている。きわめて有害であるにもかかわらず、５－ＦＵは、局所を含む広範囲のキャリアに適用可能であり、３から１５ｍｇ／ｋｇ／日の範囲の用量の静脈内投与は一般的に使用されている。

【０２６８】

ＤＮＡの損傷を引き起こし、広範に使用されている他の因子は、γ線としても一般に公

知の因子、Ｘ線および／または放射性同位元素の腫瘍細胞への送達を含む。ＤＮＡ損傷因子の他の形態は、マイクロ波およびＵＮ照射などもまた企図される。これらの因子のすべてが、ＤＮＡの前駆体、ＤＮＡの複製および修復ならびに染色体のアセンブリおよび維持に関して広範囲の損傷ＤＮＡをもたらす可能性が最も高い。Ｘ線の線量範囲は、長期間（３から４週）については１日の線量が５０から２００レントゲン、単回線量は２０００から６０００レントゲンの範囲である。放射性同位元素の線量範囲は大きく変動し、同位元素の半減期、放射される照射線の強度および型ならびに新生細胞による取り込みに依存する。

【０２６９】

Ｆ．免疫検出キット

その上さらなる実施形態において、本発明は、上記の免疫検出方法に使用する免疫検出キットに関する。免疫検出キットは、適切な容器手段中に、ヒト抗ヌクレオリン抗体および場合により免疫検出試薬を含むものである。

【０２７０】

特定の実施形態において、抗体は、固体支持体、例えば、カラムマトリックスおよび／またはマイクロタイタープレートのウェルに予め結合されていてよい。キットの免疫検出試薬は、所与の抗体に付随または連結した検出可能な標識を含む、様々な形態の任意の１種を取ることができる。二次結合リガンドに付随または結合した検出可能な標識もまた企図される。例示的二次リガンドは、一次抗体に対する結合親和性を有する二次抗体である。

【０２７１】

本発明のキットに使用するためのさらに適切な免疫検出試薬は、一次抗体に対する結合親和性を有する二次抗体と一緒に二次抗体に対する結合親和性を有する三次抗体を含み、三次抗体が検出可能な標識に連結している、２成分の試薬を含む。上記のように、多数の例示的標識が当分野において公知であり、このような標識はすべて本発明に関連して用いることができる。

【０２７２】

本キットは、検出アッセイのための標準曲線を調整するために使用できる、標識されているか、または標識されていないどちらかの、適切にアリコートされたヌクレオリンの組成物をさらに含むことができる。本キットは、完全にコンジュゲートされた形態、中間体の形態またはキットの使用者によりコンジュゲートされる別々の部分のいずれかの、抗体標識コンジュゲートを含有することができる。キットの構成要素は、水性媒体または凍結乾燥形態で包装することができる。

【０２７３】

キットの容器手段は、一般的に、抗体を配置できる、または好ましくは適切にアリコートできる、少なくとも１つのバイアル、試験管、フラスコ、ビン、注射器または他の容器手段を含むものである。本発明のキットは、通常、市販するために厳重に密閉された、抗体、抗原を含有するための手段および任意の他の試薬容器を含むものである。このような容器は、所望のバイアルが保有される、射出成形容器またはブロー成形プラスチック容器を含むことができる。

【実施例】

【０２７４】

ＶＩＩ．実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。後に続く実施例に開示される技術は、本発明の実践において十分機能するように本発明者により発見された技術を表すことは、当業者に理解されるはずであり、したがって、その実践に関する好ましい様式を構成すると考えることができる。しかし、当業者は、本開示を考慮すると、開示された特定の実施形態において多くの変更が可能であり、本発明の精神および範囲を逸脱することなく同様のまたは類似の結果をさらに得ることを理解するべきである。

【０２７５】

本発明の一態様では、ヒトヌクレオリンに結合する抗体を分泌する不死化ヒトＢ細胞を生成する方法であって、ＩｇＭ陽性ヒトＢ細胞の集団を得るステップと、前記集団を、前記ヒトＢ細胞を不死化させるエプスタイン－バーウイルス（ＥＢＶ）、ならびにＩｇＭからＩｇＧへの免疫グロブリンアイソタイプのクラススイッチを誘導するサイトカイン／増殖因子／シグナル伝達剤カクテルと接触させるステップと、前記不死化ならびに免疫グロブリンアイソタイプのクラススイッチを支援する条件下で細胞を培養するステップとを含む方法が提供される。一実施形態では、該方法が、ヒトヌクレオリンに対する抗体を発現する不死化ヒトＢ細胞を選択するステップをさらに含む。別の実施形態では、選択するステップが、不死化Ｂ細胞の培養培地上清に対して実施されるイムノアッセイを含む。別の実施形態では、サイトカインカクテルが、ヒトＢ細胞に対する共起刺激シグナルを送達する作用物質を含む。別の実施形態では、サイトカインカクテルが、抗ＩｇＭ Ｆ（ａｂ’）$_2$；インターロイキン（ＩＬ）－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、ＩＮＦα、ＢＡＦＦ、可溶性ＣＤ４０Ｌを含む。別の実施形態では、ＩｇＭ陽性ヒトＢ細胞を、末梢血、扁桃腺、骨髄、脾臓、リンパ節、臍帯血、肝臓、アフェレーシス手順、またはバフィコートから得る。別の実施形態では、該方法が、ステップ（ｄ）の不死化ヒトＢ細胞から、重鎖および／または軽鎖の全体をコードする核酸を単離するステップをさらに含む。別の実施形態では、ステップ（ｄ）の不死化ヒトＢ細胞から、重鎖および／または軽鎖の抗原結合領域をコードする核酸を単離するステップをさらに含む。別の実施形態では、該方法が、前記核酸を、重鎖および／または軽鎖のフレームワーク領域をコードする核酸へとクローニングするステップをさらに含む。別の実施形態では、前記集団を接触させるステップが、感染時におけるＥＢＶの濃縮ステップ、遠心分離ステップ、またはこれらの両方をさらに含む。別の実施形態では、該方法が、ステップ（ｃ）の後に、前記ヒトＢ細胞集団を凍結させるステップをさらに含む。別の実施形態では、ステップ（ｂ）（ｉｉ）の約０～９６時間後に、前記集団を、サイトカイン／増殖因子／シグナル伝達剤カクテルと接触させるステップを実施する。別の実施形態では、ステップ（ｂ）（ｉｉ）の約１６～２０時間後に、前記集団を、サイトカイン／増殖因子／シグナル伝達剤カクテルと接触させるステップを実施する。別の実施形態では、前記集団のうちの約５０％～９９％を、ＥＢＶ感染により不死化させる。別の実施形態では、前記集団のうちの約９５％～９９％を、ＥＢＶ感染により不死化させる。別の実施形態では、ヒトヌクレオリンに対する抗体を発現する不死化ヒトＢ細胞を選択するステップを、感染の１～４週間後に行う。別の実施形態では、ヒトヌクレオリンに対する抗体を発現する不死化ヒトＢ細胞を選択するステップを、感染の２～３週間後に行う。別の実施形態では、ヒトヌクレオリンに対する抗体を発現する不死化ヒトＢ細胞を選択するステップを、凍結保存した不死化Ｂ細胞を融解させた後に、かつ／または凍結保存した前記不死化Ｂ細胞に由来する培養培地上清を融解させた後に行う。別の実施形態では、Ｂ細胞が、抗原ナイーブ細胞である。別の実施形態では、Ｂ細胞が、抗原経験細胞である。

【０２７６】

別の態様では、本発明が、ヒトヌクレオリンに結合するＩｇＧ抗体を発現する、不死化ヒトＢ細胞を提供する。一実施形態では、不死化ヒトＢ細胞が、Ｔ－５Ｄ１、Ｖ－３Ｈ１１（３Ｇ５）、Ｔ－２Ｄ３、Ｔ－７Ｇ７（１Ｈ９）、Ｔ－２Ｈ３、Ｔ－９Ｆ９、Ｔ－８Ｇ４、またはＴ－Ｐ１Ｃ６と命名されている。

【０２７７】

別の態様では、本発明が、配列番号２のタンパク質に結合するＩｇＧ抗体またはその断片を発現する、不死化ヒトＢ細胞を提供する。一実施形態では、ＩｇＧ抗体が、ＩｇＧ１抗体、ＩｇＧ２抗体、ＩｇＧ３抗体、またはＩｇＧ４抗体である。別の実施形態では、ＩｇＧ抗体が、ＩｇＧ１抗体である。別の実施形態では、ＩｇＧ抗体が、カッパ軽鎖を含む。別の実施形態では、ＩｇＧ抗体が、ラムダ軽鎖を含む。別の実施形態では、Ｂ細胞を、ＥＢＶにより不死化させる。別の実施形態では、抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒト抗体またはそ

の断片である。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも３０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも４０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも５０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも６０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも７０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも８０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも９０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１００％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも１０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも３０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも４０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも５０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも６０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも７０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも８０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも９０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも１００％を死滅させる。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインに結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインを不活化させる。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体依存性細胞傷害作用を誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体非依存性細胞傷害作用を誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその

断片が、接触時に癌細胞においてアポトーシスを誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、ＡＭＬ癌細胞、ＣＬＬ癌細胞、または乳癌細胞を阻害するかまたは死滅させる。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞におけるＢＣＬ－２レベルを低減する。

【０２７８】

別の態様では、本発明が、配列番号１によりコードされるタンパク質に結合するＩｇＧ抗体またはその断片を発現する、不死化ヒトＢ細胞を提供する。一実施形態では、ＩｇＧ抗体が、ＩｇＧ１抗体、ＩｇＧ２抗体、ＩｇＧ３抗体、またはＩｇＧ４抗体である。別の実施形態では、ＩｇＧ抗体が、ＩｇＧ１抗体である。別の実施形態では、ＩｇＧ抗体が、カッパ軽鎖を含む。別の実施形態では、ＩｇＧ抗体が、ラムダ軽鎖を含む。別の実施形態では、Ｂ細胞を、ＥＢＶにより不死化させる。別の実施形態では、抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。ヒトに対して実質的に非免疫原性である、請求項３３に記載の単離抗体またはその断片。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも３０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも４０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも５０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも６０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも７０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも８０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも９０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１００％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも１０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも３０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも４０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも５０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも６０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時

間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも７０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも８０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも９０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも１００％を死滅させる。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインに結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインを不活化する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体依存性細胞傷害作用を誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体非依存性細胞傷害作用を誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、接触時に癌細胞においてアポトーシスを誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、ＡＭＬ癌細胞、ＣＬＬ癌細胞、または乳癌細胞を阻害するかまたは死滅させる。別の実施形態では、単離モノクローナル抗体またはその断片が、癌細胞におけるＢＣＬ－２レベルを低減する。

【０２７９】

別の態様では、本発明が、配列番号４を含むタンパク質に結合するＩｇＧ抗体またはその断片を発現する、不死化ヒトＢ細胞を提供する。一実施形態では、ＩｇＧ抗体が、ＩｇＧ１抗体、ＩｇＧ２抗体、ＩｇＧ３抗体、またはＩｇＧ４抗体である。別の実施形態では、ＩｇＧ抗体が、ＩｇＧ１抗体である。別の実施形態では、ＩｇＧ抗体が、カッパ軽鎖を含む。別の実施形態では、ＩｇＧ抗体が、ラムダ軽鎖を含む。別の実施形態では、Ｂ細胞を、ＥＢＶにより不死化させる。別の実施形態では、モノクローナル抗体またはその断片である、請求項３３に記載の単離抗体またはその断片。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも３０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも４０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも５０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも６０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも７０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも８０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも９０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１００％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗

体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも１０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも３０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも４０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも５０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも６０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも７０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも８０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも９０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも１００％を死滅させる。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインに結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインを不活化させる。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体依存性細胞傷害作用を誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体非依存性細胞傷害作用を誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、接触時に癌細胞においてアポトーシスを誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、ＡＭＬ癌細胞、ＣＬＬ癌細胞、または乳癌細胞を阻害するかまたは死滅させる。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞におけるＢＣＬ－２レベルを低減する。

【０２８０】

別の態様では、本発明が、配列番号３によりコードされるタンパク質に結合するＩｇＧ抗体またはその断片を発現する、不死化ヒトＢ細胞を提供する。一実施形態では、ＩｇＧ抗体が、ＩｇＧ１抗体、ＩｇＧ２抗体、ＩｇＧ３抗体、またはＩｇＧ４抗体である。別の実施形態では、ＩｇＧ抗体が、ＩｇＧ１抗体である。別の実施形態では、ＩｇＧ抗体が、カッパ軽鎖を含む。別の実施形態では、ＩｇＧ抗体が、ラムダ軽鎖を含む。別の実施形態では、Ｂ細胞を、ＥＢＶにより不死化させる。別の実施形態では、抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインに結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインを不活化させる。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体依存性細胞傷害作用を誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体非依存性細胞傷害作用を誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、接触時に癌細胞においてアポトーシスを誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその

断片が、ＡＭＬ癌細胞、ＣＬＬ癌細胞、または乳癌細胞を阻害するかまたは死滅させる。別の実施形態では、単離モノクローナル抗体またはその断片が、癌細胞におけるＢＣＬ－２レベルを低減する。

【０２８１】

別の態様では、本発明が、配列番号４のタンパク質に特異的に結合する、単離ヒトモノクローナル抗体またはその断片を提供する。一実施形態では、抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも３０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも４０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも５０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも６０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも７０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも８０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも９０％を死滅させる。別の実施形態では、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１００％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも１０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも３０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも４０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも５０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも６０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも７０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも８０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも９０％を死滅させる。別の実施形態では、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベート

すると、抗体またはその断片が、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも１００％を死滅させる。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインに結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインを不活化させる。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体依存性細胞傷害作用を誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体非依存性細胞傷害作用を誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、接触時に癌細胞においてアポトーシスを誘導する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、ＡＭＬ癌細胞、ＣＬＬ癌細胞、または乳癌細胞を阻害するかまたは死滅させる。別の実施形態では、単離モノクローナル抗体またはその断片が、癌細胞におけるＢＣＬ－２レベルを低減する。

【０２８２】

別の態様では、本発明が、ヒトヌクレオリンタンパク質に特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる、単離抗体またはその断片を提供する。一実施形態では、前記ヒトヌクレオリンのアミノ酸配列が、配列番号２を含む。別の実施形態では、抗体またはその断片が、配列番号２のアミノ酸残基１～２８３からなるアミノ酸配列に結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインに結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインを不活化させる。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、診断剤または治療剤に連結されている。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体依存性細胞傷害作用を呈示する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体非依存性細胞傷害作用を呈示する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、接触時に癌細胞においてアポトーシスを誘導する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ＡＭＬ癌細胞、ＣＬＬ癌細胞、または乳癌細胞を阻害するかまたは死滅させる。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞におけるＢＣＬ－２レベルを低減する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、診断剤に連結されている。別の実施形態では、診断剤が、放射性核種、フルオロフォア、化学発光化合物、蛍光化合物、または酵素である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、治療剤に連結されている。別の実施形態では、治療剤が、放射性核種、毒素、または化学療法剤部分である。

【０２８３】

別の態様では、本発明が、ヒトヌクレオリンタンパク質に特異的に結合する単離抗体またはその断片であって、前記ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの少なくとも１０～１００％（ＭＶ４－１１細胞の集団のうちの１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、または１００％など）を死滅させる、単離抗体またはその断片を提供する。別の実施形態では、前記ヒトヌクレオリンのアミノ酸配列が、配列番号２を含む。別の実施形態では、抗体またはその断片が、配列番号２のアミノ酸残基１～２８３からなるアミノ酸配列に結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインに結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインを不活化させる。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、診断剤または治療剤に連結されている。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体依存性細胞傷害作用を呈示する。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞に対する補体非依存性細胞傷害作用を呈示する。別の実施形態では、単離抗体またはその

断片が、接触時に癌細胞においてアポトーシスを誘導する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、ＡＭＬ癌細胞、ＣＬＬ癌細胞、または乳癌細胞を阻害するかまたは死滅させる。別の実施形態では、単離抗体またはその断片が、癌細胞におけるＢＣＬ－２レベルを低減する。別の実施形態では、前記抗体またはその断片が、診断剤に連結されている。別の実施形態では、診断剤が、放射性核種、フルオロフォア、化学発光化合物、蛍光化合物、または酵素である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、治療剤に連結されている。別の実施形態では、治療剤が、放射性核種、毒素、または化学療法剤部分である。

【０２８４】

別の態様では、本発明が、ヒトヌクレオリンタンパク質に特異的に結合する１または複数の単離抗体またはそれらの断片を含む抗ヌクレオリン組成物であって、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８～９６時間（４８、７２、または９６時間など）にわたりインキュベートすると、前記１または複数の抗体が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１０～１００％（１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、または１００％など）を死滅させる、抗ヌクレオリン組成物を提供する。一実施形態では、１または複数の単離抗体またはそれらの断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。別の実施形態では、１または複数の単離抗体またはそれらの断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、１または複数の単離抗体またはそれらの断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、１または複数の単離抗体またはそれらの断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインに結合する。別の実施形態では、１または複数の単離抗体またはそれらの断片が、ヒトヌクレオリンのＲＮＡ結合ドメインを不活化させる。別の実施形態では、前記ヒトヌクレオリンのアミノ酸配列が、配列番号２を含む。別の実施形態では、１または複数の単離抗体またはそれらの断片が、配列番号４に結合する。別の実施形態では、抗ヌクレオリン組成物が、放射性核種、フルオロフォア、化学発光化合物、蛍光化合物、酵素、毒素、または化学療法剤をさらに含む。別の実施形態では、放射性核種、フルオロフォア、化学発光化合物、蛍光化合物、酵素、毒素、または化学療法剤が、前記１または複数の単離抗体またはそれらの断片にコンジュゲートされている。別の実施形態では、抗ヌクレオリン組成物が、前記ヒトヌクレオリンタンパク質に特異的に結合する２つ以上の単離抗体またはそれらの断片を含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、前記１または複数の抗体が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる。別の実施形態では、抗ヌクレオリン組成物が、前記ヒトヌクレオリンタンパク質に特異的に結合する３つ以上の単離抗体またはそれらの断片を含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、前記１または複数の抗体が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる。

【０２８５】

本発明の別の態様では、ヌクレオリンをその表面に発現する細胞を阻害するかまたは死滅させる方法であって、前記細胞を、ヒトヌクレオリンに結合する抗体またはその断片と接触させるステップを含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、前記抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる方法が提供される。一実施形態では、抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、配列番号２に結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、配列番号１によりコードされるアミノ酸配列に結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、配列番号４に結合する。別の実施形態では、抗体またはその断片が、配列番号３によりコードされるアミノ酸配列に結合する。別の実施形態では、細胞が、癌細胞である。別の実施形態では、癌細胞が、肺癌細胞、乳癌細胞、前立腺癌細胞、結腸癌細胞、膵臓癌細胞、腎細胞癌細胞、卵巣癌細胞、白血病細胞、黒色腫細胞、膠芽腫細胞、神経芽腫細胞、肉腫細胞、または胃癌細胞である。別の実施形態では、細胞が、免疫細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、リンパ球、樹状細胞、末梢血単球、マクロファージ、または神経膠細胞である。

別の実施形態では、免疫細胞が、活性化免疫細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、活性化Ｂ細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、メモリーＢ細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、活性化Ｔ細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、活性化ＣＤ４＋Ｔ細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、活性化ＣＤ８＋Ｔ細胞である。別の実施形態では、細胞が、血管平滑筋細胞または内皮細胞である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、治療剤に連結されている。別の実施形態では、治療剤が、放射性核種、毒素、または化学療法剤である。別の実施形態では、阻害するかまたは死滅させることが、前記細胞においてアポトーシスを誘導するステップを含む。別の実施形態では、細胞が、ヒト被験体体内に存在し、前記接触させるステップが、前記抗体またはその断片を前記被験体に投与するステップを含む。別の実施形態では、前記細胞を、少なくとも１つのさらなる阻害剤または治療と接触させるステップをさらに含む。別の実施形態では、さらなる治療が、手術、放射線療法、化学療法、毒素療法、免疫療法、ホルモン療法、抗血管新生療法、もしくは遺伝子療法、または他の生物学的療法のうちの１または複数を含む。別の実施形態では、さらなる阻害剤が、放射性核種、化学療法剤、毒素、免疫療法剤、ホルモン、核酸、またはポリペプチドのうちの１または複数を含む。別の実施形態では、毒素が、ジフテリア毒素、外毒素Ａ鎖、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシンＡ鎖、アルファ－サルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ジアンチンタンパク質、Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ（ｐｈｙｔｏｌａｃａ）ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質、ブタクサ抗ウイルス性タンパク質、Ｍｏｍｏｒｄｉｃａ（ｍｏｍｏｒｄｉｃａ）ｃｈａｒａｎｔｉａ阻害剤、クルシン、クロチン、Ｓａｐａｏｎａｒｉａ（ｓａｐａｏｎａｒｉａ）ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、カリケアマイシン、またはトリコテセン毒素である。別の実施形態では、化学療法剤が、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞骨格破壊剤、エポチロン、トポイソメラーゼＩ阻害剤、トポイソメラーゼＩＩ阻害剤、ヌクレオシド類似体もしくはヌクレオチド類似体、前駆体類似体、ペプチド抗生物質、白金ベースの薬剤、レチノイド、ビンカアルカロイド、またはこれらの誘導体である。別の実施形態では、前記療法剤が、アクチノマイシン－Ｄ、ａｌｌ－ｔｒａｎｓレチノイン酸、アザシチジン、アドリアマイシン、アザチオプリン、ブレオマイシン、カンプトテシン、カルボプラチン、カペシタビン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エポチロン、エトポシド、フルオロウラシル、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、過酸化水素、イダルビシン、イマチニブ、メクロレタミン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシンＣ、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、バルルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、またはビノレルビンである。

【０２８６】

本発明の一態様では、ヌクレオリンをその表面に発現する細胞を検出する方法であって、前記細胞を、前記ヌクレオリンに免疫学的に結合するヒト抗体またはその断片と接触させるステップを含む方法が提供される。一実施形態では、細胞が、癌細胞、免疫細胞、ヌクレオリンをその表面に発現する血管平滑筋細胞、ヌクレオリンをその表面に発現する内皮細胞、またはウイルスに感染した細胞である。別の実施形態では、細胞が、ヌクレオリンをその表面に発現する前癌性細胞である。別の実施形態では、癌細胞が、肺癌細胞、乳癌細胞、前立腺癌細胞、結腸癌細胞、膵臓癌細胞、腎細胞癌細胞、卵巣癌細胞、白血病細胞、黒色腫細胞、膠芽腫細胞、神経芽腫細胞、肉腫細胞、または胃癌細胞からなる群から選択される。別の実施形態では、免疫細胞が、リンパ球、樹状細胞、末梢血単球、マクロファージ、または神経膠細胞である。別の実施形態では、細胞が、免疫細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、活性化免疫細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、活性化Ｂ細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、メモリーＢ細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、活性化Ｔ細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、活性化ＣＤ４＋Ｔ細胞である。別の実施形態では、免疫細胞が、活性化ＣＤ８＋Ｔ細胞である。別の

実施形態では、細胞が、血管平滑筋細胞または内皮細胞である。別の実施形態では、抗体またはその断片が、診断剤に連結されている。別の実施形態では、診断剤が、放射性核種、フルオロフォア、化学発光化合物、蛍光化合物、量子ドット、ナノ粒子、または酵素である。別の実施形態では、細胞が、ヒト被験体体内に存在し、前記接触させるステップが、前記抗体またはその断片を前記被験体に投与するステップを含む。別の実施形態では、細胞が、単離組織試料中または単離細胞懸濁液中に存在する。

【０２８７】

別の態様では、本発明が、哺乳動物における癌を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８～９６時間（４８、７２、または９６時間など）にわたりインキュベートすると、前記抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１０～１００％（１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、または１００％など）を死滅させる方法を提供する。一実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、哺乳動物において癌を治療することが、腫瘍による低酸素状態（ｈｐｏｘｉａ）を治療するステップを含む。別の実施形態では、哺乳動物において癌を治療することが、腫瘍による血管新生を阻害するステップを含む。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリンモノクローナル抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。別の実施形態では、毒素が、ジフテリア毒素、外毒素Ａ鎖、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシンＡ鎖、アルファ－サルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ジアンチンタンパク質、Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ（ｐｈｙｔｏｌａｃａ） ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質、ブタクサ抗ウイルス性タンパク質、Ｍｏｍｏｒｄｉｃａ（ｍｏｍｏｒｄｉｃａ） ｃｈａｒａｎｔｉａ阻害剤、クルシン、クロチン、Ｓａｐａｏｎａｒｉａ（ｓａｐａｏｎａｒｉａ） ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、カリケアマイシン、またはトリコテセン毒素である。別の実施形態では、化学療法剤が、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞骨格破壊剤、エポチロン、トポイソメラーゼＩ阻害剤、トポイソメラーゼＩＩ阻害剤、ヌクレオシド類似体もしくはヌクレオチド類似体、前駆体類似体、ペプチド抗生物質、白金ベースの薬剤、レチノイド、ビンカアルカロイド、またはこれらの誘導体である。別の実施形態では、化学療法剤が、アクチノマイシン－Ｄ、ａｌｌ－ｔｒａｎｓレチノイン酸、アザシチジン、アドリアマイシン、アザチオプリン、ブレオマイシン、カンプトテシン、カルボプラチン、カペシタビン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エポチロン、エトポシド、フルオロウラシル、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、過酸化水素、イダルビシン、イマチニブ、メクロレタミン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシンＣ、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、バルルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、またはビノレルビンである。

【０２８８】

別の態様では、本発明が、哺乳動物における癌を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン抗体またはその断片、毒素または化学療法剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８～９６時間（４８、７２、または９６時間など）にわたりインキュベートすると、前記抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１０～１００％（１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、または１００％など）を死滅させる方法を提供する。一実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、哺乳動物において癌を治療することが、腫瘍による低酸素状態（ｈｐｏｘ

ｉａ）を治療するステップを含む。別の実施形態では、哺乳動物において癌を治療することが、腫瘍による血管新生を阻害するステップを含む。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリンモノクローナル抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。別の実施形態では、毒素が、ジフテリア毒素、外毒素Ａ鎖、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシンＡ鎖、アルファ－サルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ジアンチンタンパク質、Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ（ｐｈｙｔｏｌａｃａ）ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質、ブタクサ抗ウイルス性タンパク質、Ｍｏｍｏｒｄｉｃａ（ｍｏｍｏｒｄｉｃａ）ｃｈａｒａｎｔｉａ阻害剤、クルシン、クロチン、Ｓａｐａｏｎａｒｉａ（ｓａｐａｏｎａｒｉａ）ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、カリケアマイシン、またはトリコテセン毒素である。別の実施形態では、化学療法剤が、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞骨格破壊剤、エポチロン、トポイソメラーゼＩ阻害剤、トポイソメラーゼＩＩ阻害剤、ヌクレオシド類似体もしくはヌクレオチド類似体、前駆体類似体、ペプチド抗生物質、白金ベースの薬剤、レチノイド、ビンカアルカロイド、またはこれらの誘導体である。別の実施形態では、化学療法剤が、アクチノマイシン－Ｄ、ａｌｌ－ｔｒａｎｓレチノイン酸、アザシチジン、アドリアマイシン、アザチオプリン、ブレオマイシン、カンプトテシン、カルボプラチン、カペシタビン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エポチロン、エトポシド、フルオロウラシル、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、過酸化水素、イダルビシン、イマチニブ、メクロレタミン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシンＣ、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、バルルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、またはビノレルビンである。

【０２８９】

別の態様では、本発明が、哺乳動物における癌を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン抗体またはその断片および薬学的に許容される担体を投与するステップと、前記哺乳動物を放射線療法でさらに治療するステップとを含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８～９６時間（４８、７２、または９６時間など）にわたりインキュベートすると、前記抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１０～１００％（１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、または１００％など）を死滅させる方法を提供する。一実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、哺乳動物において癌を治療することが、腫瘍による低酸素状態（ｈｐｏｘｉａ）を治療するステップを含む。別の実施形態では、哺乳動物において癌を治療することが、腫瘍による血管新生を阻害するステップを含む。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリンモノクローナル抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。別の実施形態では、毒素が、ジフテリア毒素、外毒素Ａ鎖、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシンＡ鎖、アルファ－サルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ジアンチンタンパク質、Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ（ｐｈｙｔｏｌａｃａ）ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質、ブタクサ抗ウイルス性タンパク質、Ｍｏｍｏｒｄｉｃａ（ｍｏｍｏｒｄｉｃａ）ｃｈａｒａｎｔｉａ阻害剤、クルシン、クロチン、Ｓａｐａｏｎａｒｉａ（ｓａｐａｏｎａｒｉａ）ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、カリケアマイシン、またはトリコテセン毒素である。別の実施形態では、化学療法剤が、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞骨格破壊剤、エポチロン、トポイソメラーゼＩ阻害剤、トポイソメラーゼＩＩ阻害剤、ヌクレオシド類似体もしくはヌク

レオチド類似体、前駆体類似体、ペプチド抗生物質、白金ベースの薬剤、レチノイド、ビンカアルカロイド、またはこれらの誘導体である。別の実施形態では、化学療法剤が、アクチノマイシン－Ｄ、ａｌｌ－ｔｒａｎｓレチノイン酸、アザシチジン、アドリアマイシン、アザチオプリン、ブレオマイシン、カンプトテシン、カルボプラチン、カペシタビン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エポチロン、エトポシド、フルオロウラシル、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、過酸化水素、イダルビシン、イマチニブ、メクロレタミン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシンＣ、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、バルルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、またはビノレルビンである。

【０２９０】

別の態様では、本発明が、哺乳動物における癌を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、配列番号４のタンパク質に特異的に結合する抗体またはその断片を含む方法を提供する。一実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、哺乳動物において癌を治療することが、腫瘍による低酸素状態を治療するステップを含む。別の実施形態では、哺乳動物において癌を治療することが、腫瘍による血管新生を阻害するステップを含む。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリンモノクローナル抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。別の実施形態では、毒素が、ジフテリア毒素、外毒素Ａ鎖、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシンＡ鎖、アルファ－サルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ジアンチンタンパク質、Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ（ｐｈｙｔｏｌａｃａ） ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質、ブタクサ抗ウイルス性タンパク質、Ｍｏｍｏｒｄｉｃａ（ｍｏｍｏｒｄｉｃａ） ｃｈａｒａｎｔｉａ阻害剤、クルシン、クロチン、Ｓａｐａｏｎａｒｉａ（ｓａｐａｏｎａｒｉａ） ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、カリケアマイシン、またはトリコテセン毒素である。別の実施形態では、化学療法剤が、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞骨格破壊剤、エポチロン、トポイソメラーゼＩ阻害剤、トポイソメラーゼＩＩ阻害剤、ヌクレオシド類似体もしくはヌクレオチド類似体、前駆体類似体、ペプチド抗生物質、白金ベースの薬剤、レチノイド、ビンカアルカロイド、またはこれらの誘導体である。別の実施形態では、化学療法剤が、アクチノマイシン－Ｄ、ａｌｌ－ｔｒａｎｓレチノイン酸、アザシチジン、アドリアマイシン、アザチオプリン、ブレオマイシン、カンプトテシン、カルボプラチン、カペシタビン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エポチロン、エトポシド、フルオロウラシル、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、過酸化水素、イダルビシン、イマチニブ、メクロレタミン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシンＣ、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、バルルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、またはビノレルビンである。

【０２９１】

哺乳動物における癌を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン抗体もしくはその断片、毒素、または化学療法剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗体またはその断片が、配列番号４のタンパク質に特異的に結合する方法。一実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、哺乳動物において癌を治療することが、腫瘍による低酸素状態（ｈｐｏｘｉａ）を治療するステップを含む。別の実施形態では、哺乳動物において癌を治療することが、腫瘍

による血管新生を阻害するステップを含む。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリンモノクローナル抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。別の実施形態では、毒素が、ジフテリア毒素、外毒素Ａ鎖、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシンＡ鎖、アルファ－サルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ジアンチンタンパク質、Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ（ｐｈｙｔｏｌａｃａ） ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質、ブタクサ抗ウイルス性タンパク質、Ｍｏｍｏｒｄｉｃａ（ｍｏｍｏｒｄｉｃａ） ｃｈａｒａｎｔｉａ阻害剤、クルシン、クロチン、Ｓａｐａｏｎａｒｉａ（ｓａｐａｏｎａｒｉａ） ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、カリケアマイシン、またはトリコテセン毒素である。別の実施形態では、化学療法剤が、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞骨格破壊剤、エポチロン、トポイソメラーゼＩ阻害剤、トポイソメラーゼＩＩ阻害剤、ヌクレオシド類似体もしくはヌクレオチド類似体、前駆体類似体、ペプチド抗生物質、白金ベースの薬剤、レチノイド、ビンカアルカロイド、またはこれらの誘導体である。別の実施形態では、化学療法剤が、アクチノマイシン－Ｄ、ａｌｌ－ｔｒａｎｓレチノイン酸、アザシチジン、アドリアマイシン、アザチオプリン、ブレオマイシン、カンプトテシン、カルボプラチン、カペシタビン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エポチロン、エトポシド、フルオロウラシル、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、過酸化水素、イダルビシン、イマチニブ、メクロレタミン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシンＣ、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、バルルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、またはビノレルビンである。

【０２９２】

別の態様では、本発明が、哺乳動物における癌を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン抗体またはその断片および薬学的に許容される担体を投与するステップと、前記哺乳動物を放射線療法でさらに治療するステップとを含み、前記抗体またはその断片が、配列番号４のタンパク質に特異的に結合する方法を提供する。一実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、哺乳動物において癌を治療することが、腫瘍による低酸素状態（ｈｐｏｘｉａ）を治療するステップを含む。別の実施形態では、哺乳動物において癌を治療することが、腫瘍による血管新生を阻害するステップを含む。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリンモノクローナル抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。別の実施形態では、毒素が、ジフテリア毒素、外毒素Ａ鎖、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシンＡ鎖、アルファ－サルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ジアンチンタンパク質、Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ（ｐｈｙｔｏｌａｃａ） ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質、ブタクサ抗ウイルス性タンパク質、Ｍｏｍｏｒｄｉｃａ（ｍｏｍｏｒｄｉｃａ） ｃｈａｒａｎｔｉａ阻害剤、クルシン、クロチン、Ｓａｐａｏｎａｒｉａ（ｓａｐａｏｎａｒｉａ） ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、カリケアマイシン、またはトリコテセン毒素である。別の実施形態では、化学療法剤が、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞骨格破壊剤、エポチロン、トポイソメラーゼＩ阻害剤、トポイソメラーゼＩＩ阻害剤、ヌクレオシド類似体もしくはヌクレオチド類似体、前駆体類似体、ペプチド抗生物質、白金ベースの薬剤、レチノイド、ビンカアルカロイド、またはこれらの誘導体である。別の実施形態では、化学療法剤が、アクチノマイシン－Ｄ、ａｌｌ－ｔｒａｎｓレチノイン酸、アザシチジン、アドリアマイシン、アザチオプリン、ブレオマイシン、カンプトテシン、カルボプ

ラチン、カペシタビン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エポチロン、エトポシド、フルオロウラシル、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、過酸化水素、イダルビシン、イマチニブ、メクロレタミン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシンＣ、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、バルルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、またはビノレルビンである。

【０２９３】

別の態様では、本発明が、哺乳動物における自己免疫疾患を治療する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８～９６時間（４８、７２、または９６時間など）にわたりインキュベートすると、前記抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１０～１００％（１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、または１００％など）を死滅させる方法を提供する。一実施形態では、自己免疫疾患が、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、喘息、自己免疫性副腎疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎および自己免疫性抗癌炎、自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスプルー－皮膚炎、慢性疲労性免疫不全症候群（ＣＦＩＤＳ）、慢性炎症性脱髄性多発性神経障害、チャーグ－ストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡、ＣＲＥＳＴ症候群、寒冷凝集素症、クローン病、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、疱疹状皮膚炎、糖尿病（例えば、１型）、好酸球性筋膜炎、線維筋痛症－線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン－バレー症候群、橋本甲状腺炎、ヘノッホ－シェーンライン紫斑病、特発性肺線維症、特発性／自己免疫性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、ＩｇＡ性神経障害、若年性関節炎、扁平苔癬、エリテマトーデス、メニエール病、混合型結合組織病、多発性硬化症、１型糖尿病または免疫媒介性糖尿病、重症筋無力症、天疱瘡関連障害（例えば、尋常性天疱瘡）、骨髄異形成症候群、悪性貧血、結節性動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性自己免疫性症候群、リウマチ性多発性筋痛、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティッフマン症候群、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、スイート症候群、スティル病、エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭部動脈炎／巨細胞動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、血管炎、尋常性白斑、およびウェゲナー肉芽腫症である。炎症性障害の例には、喘息、脳炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、アレルギー性障害、敗血症性ショック、肺線維症、未分化型脊椎関節症、未分化型関節症、関節炎、炎症性骨溶解、移植片対宿主病、蕁麻疹、またはフォークト－小柳－原田症候群が含まれるがこれらに限定されない。別の実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。

【０２９４】

別の態様では、本発明が、哺乳動物における自己免疫疾患を治療する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、配列番号２のタンパク質に特異的に結合する、ヒト抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含む方法を提供する。一実施形態では、自己免疫疾患が、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、喘息、自己免疫性副腎疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎および自己免疫性抗癌炎、自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスプルー－皮膚炎、慢性疲労性免疫不全症候群（ＣＦＩＤＳ）、慢性炎

症性脱髄性多発性神経障害、チャーグ－ストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡、ＣＲＥＳＴ症候群、寒冷凝集素症、クローン病、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、疱疹状皮膚炎、糖尿病（例えば、１型）、好酸球性筋膜炎、線維筋痛症－線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン－バレー症候群、橋本甲状腺炎、ヘノッホ－シェーンライン紫斑病、特発性肺線維症、特発性／自己免疫性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、ＩｇＡ性神経障害、若年性関節炎、扁平苔癬、エリテマトーデス、メニエール病、混合型結合組織病、多発性硬化症、１型糖尿病または免疫媒介性糖尿病、重症筋無力症、天疱瘡関連障害（例えば、尋常性天疱瘡）、骨髄異形成症候群、悪性貧血、結節性動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性自己免疫性症候群、リウマチ性多発性筋痛、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティッフマン症候群、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、スイート症候群、スティル病、エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭部動脈炎／巨細胞動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、血管炎、尋常性白斑、およびウェゲナー肉芽腫症である。炎症性障害の例には、喘息、脳炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、アレルギー性障害、敗血症性ショック、肺線維症、未分化型脊椎関節症、未分化型関節症、関節炎、炎症性骨溶解、移植片対宿主病、蕁麻疹、またはフォークト－小柳－原田症候群が含まれるがこれらに限定されない。別の実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。

【０２９５】

別の態様では、本発明が、哺乳動物における自己免疫疾患を治療する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、配列番号４のタンパク質に特異的に結合する、抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含む方法を提供する。一実施形態では、自己免疫疾患が、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、喘息、自己免疫性副腎疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎および自己免疫性抗癌炎、自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスプルー－皮膚炎、慢性疲労性免疫不全症候群（ＣＦＩＤＳ）、慢性炎症性脱髄性多発性神経障害、チャーグ－ストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡、ＣＲＥＳＴ症候群、寒冷凝集素症、クローン病、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、疱疹状皮膚炎、糖尿病（例えば、１型）、好酸球性筋膜炎、線維筋痛症－線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン－バレー症候群、橋本甲状腺炎、ヘノッホ－シェーンライン紫斑病、特発性肺線維症、特発性／自己免疫性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、ＩｇＡ性神経障害、若年性関節炎、扁平苔癬、エリテマトーデス、メニエール病、混合型結合組織病、多発性硬化症、１型糖尿病または免疫媒介性糖尿病、重症筋無力症、天疱瘡関連障害（例えば、尋常性天疱瘡）、骨髄異形成症候群、悪性貧血、結節性動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性自己免疫性症候群、リウマチ性多発性筋痛、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティッフマン症候群、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、スイート症候群、スティル病、エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭部動脈炎／巨細胞動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、血管炎、尋常性白斑、およびウェゲナー肉芽腫症である。炎症性障害の例には、喘息、脳炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、アレルギー性障害、敗血症性ショック、肺線維症、未分化型脊椎関節症、未分化型関節症、関節炎、炎症性骨溶解、移植片対宿主病、蕁麻疹、またはフォークト－小柳－原田症候群が含まれるがこれらに限定されない。別の実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、

抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。

【０２９６】

別の態様では、本発明が、哺乳動物における気道疾患を治療する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８～９６時間（４８、７２、または９６時間）にわたりインキュベートすると、前記抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１０～１００％（１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、９０、１００％）を死滅させる方法を提供する。別の実施形態では、気道疾患が、喘息、慢性閉塞性肺疾患、特発性肺線維症、または炎症性肺炎である。別の実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。

【０２９７】

別の態様では、本発明が、哺乳動物における気道疾患を治療する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤ならびに薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、配列番号２のタンパク質に特異的に結合するヒト抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含む方法を提供する。別の実施形態では、気道疾患が、喘息、慢性閉塞性肺疾患、特発性肺線維症、または炎症性肺炎である。別の実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。

【０２９８】

別の態様では、本発明が、哺乳動物における気道疾患を治療する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤ならびに薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、配列番号４のタンパク質に特異的に結合する、抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含む方法を提供する。別の実施形態では、気道疾患が、喘息、慢性閉塞性肺疾患、特発性肺線維症、または炎症性肺炎である。別の実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。

【０２９９】

別の態様では、本発明が、哺乳動物におけるウイルスに感染した細胞を治療する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、前記抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも２０％を死滅させる方法を提供する。別の実施形態では、ウイルスに感染した細胞が、ＨＩＶウイルスに感染している。別の実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。

【０３００】
別の態様では、本発明が、哺乳動物におけるウイルスに感染した細胞を治療する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、配列番号２のタンパク質に特異的に結合するヒト抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含む方法を提供する。別の実施形態では、ウイルスに感染した細胞が、ＨＩＶウイルスに感染している。別の実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、抗ヌクレオリンモノクローナル抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。

【０３０１】
別の態様では、本発明が、哺乳動物におけるウイルスに感染した細胞を治療する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、配列番号４のタンパク質に特異的に結合する、抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含む方法を提供する。別の実施形態では、ウイルスに感染した細胞が、ＨＩＶウイルスに感染している。別の実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、抗ヌクレオリンモノクローナル抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。

【０３０２】
別の態様では、本発明が、ヌクレオリンの表面発現の増大を特徴とする、哺乳動物における非癌性状態または非癌性疾患を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含み、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８～９６時間（４８、７２、または９６時間など）にわたりインキュベートすると、前記抗体またはその断片が、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも１０～１００％（１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、または１００％など）を死滅させる方法を提供する。一実施形態では、ヌクレオリンの表面発現の増大を特徴とする、哺乳動物における非癌性状態または非癌性疾患が、黄斑変性、糖尿病性網膜症、または炎症性疾患である。別の実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、抗ヌクレオリンモノクローナル抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。

【０３０３】
別の態様では、本発明が、ヌクレオリンの表面発現の増大を特徴とする、哺乳動物における非癌性状態または非癌性疾患を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、配列番号２のタンパク質に特異的に結合する、ヒト抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含む方法を提供する。一実施形態では、ヌクレオリンの表面発現の増大を特徴とする、哺乳動物における該状態または疾患が、黄斑変性、糖尿病性網膜症、または炎症性疾患である。別の実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、抗ヌクレオリンモノクローナル抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。

【０３０４】
別の態様では、本発明が、ヌクレオリンの表面発現の増大を特徴とする、哺乳動物における非癌性状態または非癌性疾患を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物に、

治療有効量の抗ヌクレオリン剤および薬学的に許容される担体を投与するステップを含み、前記抗ヌクレオリン剤が、配列番号４のタンパク質に特異的に結合する、抗ヌクレオリン抗体またはその断片を含む方法を提供する。一実施形態では、ヌクレオリンの表面発現の増大を特徴とする、哺乳動物における該状態または疾患が、黄斑変性、糖尿病性網膜症、または炎症性疾患である。別の実施形態では、哺乳動物が、ヒトである。別の実施形態では、抗ヌクレオリンモノクローナル抗体またはその断片が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、ヒト抗体またはその断片である。別の実施形態では、抗ヌクレオリン抗体またはその断片が、モノクローナル抗体またはその断片である。

【０３０５】

別の態様では、本発明が、ＭＣＦ－７細胞およびヒトＡＢ血清と共に４８時間にわたりインキュベートすると、前記ＭＣＦ－７細胞の集団のうちの少なくとも５０％を死滅させる、抗ヌクレオリン剤を提供する。別の実施形態では、前記抗ヌクレオリン剤がヒトに対して実質的に非免疫原性である。

【０３０６】

別の態様では、本発明が、ＭＣＦ－７細胞およびＭＣＦ１０Ａ細胞の個別の集団および熱不活化血清と共に７２または９６時間にわたりインキュベートすると、ＭＣＦ１０Ａ細胞より多くのＭＣＦ－７細胞を死滅させる、抗ヌクレオリン剤を提供する。別の実施形態では、前記抗ヌクレオリン剤がヒトに対して実質的に非免疫原性である。

【０３０７】

別の態様では、本発明が、ＭＣＦ－７細胞およびＭＣＦ１０Ａ細胞の個別の集団およびヒトＡＢ血清と共に９６時間にわたりインキュベートすると、ＭＣＦ１０Ａ細胞より多くのＭＣＦ－７細胞を死滅させる、抗ヌクレオリン剤を提供する。別の実施形態では、前記抗ヌクレオリン剤がヒトに対して実質的に非免疫原性である。

【０３０８】

別の態様では、本発明が、配列番号４のタンパク質に特異的に結合し、それらの細胞表面においてヌクレオリンを発現する１または複数の癌細胞を阻害するかまたは死滅させる、抗ヌクレオリン剤を提供する。別の実施形態では、前記抗ヌクレオリン剤が、ヒトに対して実質的に非免疫原性である。

【０３０９】

別の態様では、本発明が、１または複数の前癌性細胞における細胞表面ヌクレオリン発現の増大を検出することにより、被験体が癌を発生させる可能性を決定する方法を提供する。

【０３１０】

別の態様では、本発明が、Ｆａｂ断片、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、もしくはＦｖ断片；ダイアボディー；直鎖状抗体；単鎖抗体；または抗体断片から形成される多重特異性抗体である、前記請求項のいずれかに記載の抗体を提供する。

【０３１１】

別の態様では、本発明が、Ｆａｂ断片、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、もしくはＦｖ断片；ダイアボディー；直鎖状抗体；単鎖抗体；または抗体断片から形成される多重特異性抗体である抗体断片の使用を含む、前記請求項のいずれかに記載の方法を提供する。

【０３１２】

（実施例１）

材料および方法

扁桃腺Ｂ細胞の単離および培養。扁桃腺由来のＢ細胞を調製するために、扁桃腺組織を、１×Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃ－Ａｎｔｉｍｙｃｏｔｉｃ（Ｇｉｂｃｏ／Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　カタログ番号１５２４０－０６２）を添加した２０～３０ｍｌのダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（ＤＰＢＳ、ＣａＣｌ$_2$またはＭｇＣｌ$_2$は含まない；Ｇｉｂｃｏ／Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ　カタログ番号１４１９０１４４）

を含有する滅菌ペトリ皿（ＶＷＲ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、カタログ番号２５３８４－０８８）の内部に配置した。組織を、メスを用いて刻み、およそ１ｍｍ$^3$の小片に細分化した。２枚の滅菌顕微鏡用スライド（ＶＷＲ　カタログ番号１２－５５０－３４）のすりガラス表面の間で扁桃腺の小片を穏やかに粉砕することによって、さらなるリンパ球を放出させ、７０μｍのナイロンのストレーナー（ＢＤ　Ｆａｌｃｏｎ、カタログ番号３５２３５０、ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｔｗｏ　Ｏａｋ　Ｐａｒｋ、Ｂｅｄｆｏｒｄ、ＭＡ）を介して漉すことによって単細胞調製物を作製した。この懸濁液を、Ｆｉｃｏｌｌ（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　カタログ番号１７－１４４０－０３、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）のクッションの上に層にし（１５ｍｌのＦｉｃｏｌｌの上に３５ｍｌの試料）、１５００Ｇで２０分間分解させた。単核細胞を含有する境界層を抽出し、ＤＰＢＳを用いて2回洗浄し（１３００Ｇで７分間）、計数し、１０$^8$細胞／ｍｌでＤＰＢＳに再懸濁した。ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｉｎｃ．、Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ、ＣａｎａｄａによるＳｔｅｍＳｅｐ　Ｎｅｇａｔｉｖｅ　Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ　Ｈｕｍａｎ　Ｂ－ｃｅｌｌ　Ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ　Ｋｉｔ抗体カクテル（カタログ番号１４０６４Ａ）および磁気ビーズ（カタログ番号１９１５０）を、製造業者の指示書に従って使用し、「Ｔｈｅ　Ｂｉｇ　Ｅａｓｙ」ＥａｓｙＳｅｐ　ｍａｇｎｅｔ　（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈ．カタログ番号１８００１）の使用に関して以下の修正を用いて、高度に濃縮された（＞９５％）Ｂ細胞集団を得た。すべてのステップは、層流バイオハザードフード内で周囲温度において実施した。細胞懸濁液を、滅菌した丸底の１４ｍｌポリプロピレンチューブ（ＶＷＲ　カタログ番号６０８１８－６８９）内に配置し、等量のＳｔｅｍＳｅｐ　Ｎｅｇａｔｉｖｅ　Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ　Ｈｕｍａｎ　Ｂ－ｃｅｌｌ　Ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ　Ｋｉｔ抗体カクテルと混合し、１０分間インキュベートした。その後、抗体カクテルの体積と等量の体積の磁気ビーズ懸濁液を加え、その後１０分間インキュベートした。チューブ内の体積を、ＤＰＢＳを用いて１０ｍｌにし、チューブ（キャップなし）を磁石内に１０分間配置し、その時点でチューブの内容物を、第２の滅菌１４ｍｌのチューブ内に、（いまだに磁石内で）一注ぎで穏やかにデカンタした。Ｂ細胞がその壁に接着していない元のチューブを磁石から取り出し、第２のチューブを、１０分間の浄化インキュベーションに挿入した。第１および第２の陰性選択ステップ後に得られた濃縮されたＢ細胞懸濁液を、１５ｍｌのファルコンチューブに注ぎ、計数し、ＤＰＢＳを用いて洗浄し（１３００Ｇで７分）、３７℃、５％$CO_2$の組織培養インキュベーターにおけるｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養（一般的に１０$^5$から１０$^6$細胞／ｍｌ）のために、適切な用量の完全ＲＰＭＩ培地に再懸濁した。完全ＲＰＭＩ培地は、１０％のウシ胎児血清（ＦＢＳ、ＨｙＣｌｏｎｅ　カタログ番号ＳＨ３００８８．０３、ロット番号ＡＱＣ２３４６０、Ｌｏｇａｎ、Ｕｔａｈ）および１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン（カタログ番号１５１４０－１２２）、２ｍＭのＬ－グルタミン（カタログ番号２５０３０－０８１）、１ｍＭのピルビン酸ナトリウム（カタログ番号１１３６０－０７０）、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ（カタログ番号１５６３０－０８０）、０．１％の２－メルカプトエタノール（カタログ番号２１９８５．０２３）ならびに０．１％のＦａｌｋ’ｓ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｃｏｃｋｔａｉｌを添加したＲＰＭＩ１６４０（Ｇｉｂｃｏ／Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　カタログ番号１１８７５－０９３）含有し、Ｆａｌｋ’ｓ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｃｏｃｋｔａｉｌは５０ｍＭのαチオグリセロール（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｍ６１４５）、２０μＭのバソクプロインジスルホン酸（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｂ１１２５）、１００ｍＭのピルビン酸ナトリウム（カタログ番号１１３６０－０７０）、１ＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．４（カタログ番号１５６３０－０８０）からなる。Ｌ－グルタミン、ピルビン酸ナトリウム、ペニシリン／ストレプトマイシンおよびＨＥＰＥＳは、Ｇｉｂｃｏ／Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎから入手した。または、細胞を、濃縮エプスタイン・バーウイルスのストックによるスピンフェクション（ｓｐｉｎｆｅｃｔｉｏｎ）のために、１０$^8$細胞／ｍｌで完全ＲＰＭＩ培地に再懸濁し、下記の不死化扁桃腺Ｂ細胞のライブラリーを作製した。

【０３１３】

末梢血Ｂ細胞の単離および培養。末梢血由来のＢ細胞を調製するために、静脈血（最大１８０ｍｌ）を、凝固を防ぐために１～５ｍｌのクエン酸またはヘパリン硫酸を含有する６０ｍｌの注射器に引き抜き、等量のＤＰＢＳで希釈し、Ｆｉｃｏｌｌクッション上に層にし（１５ｍｌのＦｉｃｏｌｌの上に３５ｍｌの希釈試料）、２０００ｒｐｍで２０分間分解した。（上層から）血清を回収し、アリコートで保存した。単核細胞を含有する境界層を抽出し、ＤＰＢＳを用いて2回洗浄し（１３００Ｇで7分間）、計数し、$10^8$細胞／ｍｌでＤＰＢＳに再懸濁した。Ｂ細胞の高度に純粋な集団を、扁桃腺Ｂ細胞の単離に関する上記のように、ＳｔｅｍＳｅｐ Ｎｅｇａｔｉｖｅ Ｈｕｍａｎ Ｂ－ｃｅｌｌ Ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ Ｋｉｔ（ＳｔｅｍＣｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ．）の使用により得た。単離Ｂ細胞を洗浄し（１３００Ｇで7分）、$10^5$～$10^6$細胞／ｍｌ完全ＲＰＭＩ培地（上記）で再懸濁し、３７℃、５％$CO_2$の組織培養インキュベーターにおいて培養した。または、細胞を、濃縮エプスタイン・バーウイルスのストックによるスピンフェクションのために、$10^8$細胞／ｍｌで完全ＲＰＭＩ培地に再懸濁し、下記の不死化末梢血Ｂ細胞のライブラリーを作製した。

【０３１４】

ＥＢＶストックの調製。感染性エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）のストックの調製のために、Ｂ９５－８株ＥＢＶに慢性的に感染したマーモセットのリンパ芽球様細胞系（ＬＣＬ）であるＢ９５－８細胞（Ｍｉｌｌｅｒ ＆ Ｌｉｐｍａｎ、１９７３年）またはＥＢｆａＶ－ＧＦＰ細胞（Ｓｐｅｃｋ ら、１９９９年；上記）を、細胞密度およそ$10^5$～$2\times10^5$細胞／ｍｌで、３７℃、５％$CO_2$の組織培養インキュベーターにおいて、完全ＲＰＭＩ培地（上記）中で培養した。

【０３１５】

およそ１４０ｍｌの（Ｂ９５－８ ＥＢＶまたは組換えＥＢｆａＶ－ＧＦＰのいずれかを含有する）細胞培養液を、ホルボールミリスチン酸アセテート（ＰＭＡ、１０ｎｇ／ｍｌ、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、カタログ番号５２４４００）を用いた処理によって、溶菌ウイルス生成段階に進入するように誘導した。ＰＭＡと共に4時間のインキュベート後、ＰＭＡを培養上清から除去し、完全ＲＰＭＩ培地と交換した。細胞を、高度集密まで3から4日培養し、その時点で遠心分離（１３００Ｇで7分）により細胞を除去し、培養上清を、１５０ｍｌのＮａｌｇｅｎｅ ０．４５μｍ真空フィルター（Ｃｏｒｎｉｎｇ カタログ番号４３０３２０）を介してろ過し、細胞デブリを除去した。ろ過した上清を、１．５ｍｌのエッペンドルフチューブもしくは2ｍｌの凍結用バイアル中で、－８０℃における１ｍｌ～１．８ｍｌの保存用アリコートで、液体窒素中で急速凍結保存するか、または下記の限外ろ過によって濃縮するかのいずれかにした。

【０３１６】

ＥＢＶの濃縮。ウイルス濃縮を、ろ過したウイルス上清（１４０ｍｌ）を、７０ｍｌの限度用量を有する2つのＣｅｎｔｒｉｃｏｎ Ｐｌｕｓ－７０（１００Ｋ ＭＷ カットオフ）ユニット（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ、ＭＡ）に装填することによって、または６０ｍｌのウイルス上清を、６０ｍｌの限度用量を有する、単一のＪｕｍｂｏＳｅｐ ３００Ｋユニット（Ｐａｌｌ Ｃｏｒｐ．、Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ、Ｍｉｃｈｉｇａｎ）に連続して装填し、最大１５０ｍｌのろ過したウイルスストックを濃縮するために3回装填することによって、実施した。すべてのステップは、製造業者の指示書に従って、氷上または4℃において実施した。Ｃｅｎｔｒｉｃｏｎフィルターユニットを、最小の残余量（およそ０．５ｍｌ／ろ過ユニット）を得るまで、１５から４５分間（１５分毎にモニターした）の間遠心分離（２０００Ｇ）にかけた。ろ液を廃棄し、ウイルス含有濃縮液を、最大合計体積１４ｍｌ（または元の培養上清体積の１／１０）に完全ＲＰＭＩ培地を用いて再懸濁した。ＪｕｍｂｏＳｅｐユニットを３０００Ｇで遠心分離にかけ、約１５ｍｌの残余分または１０×濃縮ウイルスストックを得た。濃縮ウイルスストックの１ｍｌ～１．８ｍｌのアリコートを、凍結用バイアルに移し、液体窒素中で急速凍結し、保存のため－８０℃のフリーザーに移した。

【０３１７】

接種によるＢ細胞感染。Ｂ細胞を、完全ＲＰＭＩ培地に$10^6$から$10^7$細胞／ｍｌで再懸濁し、等量またはろ過ＥＢＶ上清の最大２倍量と混合し、その後Ｔ－２５フラスコに配置し、３７℃および５％$CO_2$で組織培養インキュベーターにおいて、４～６時間インキュベートした。その後培養液の体積を、所望の濃度（一般的に$10^5$から$10^6$細胞／ｍｌ）における細胞培養のために感染細胞を再懸濁するように、完全ＲＰＭＩ培地を加えることによって調整し、マルチウェルプレートに分注し、３７℃および５％$CO_2$の組織培養インキュベーターに移した。

【０３１８】

濃縮ＥＢＶストックを用いたスピンフェクションによるＢ細胞の感染。Ｂ細胞を、完全ＲＰＭＩ培地に$10^6$から$10^7$細胞／ｍｌで再懸濁し、等量もしくは１０×濃縮ＥＢＶの最大２倍量と混合し、または１０×濃縮ＥＢＶストックに$2\times10^6$から最大$2\times10^7$細胞／ｍｌで直接再懸濁し、６ウェルの組織培養プレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ　ｂｉｏ－ｏｎｅ、カタログ番号６５７６０）のウェルに配置した。（１０×を超えるＥＢＶストックの濃度は感染効率の減少をもたらす。）その後、プレートを、９００Ｇで１～２時間、周囲温度において遠心分離にかけ、その時点で感染細胞を、完全ＲＰＭＩ培地または分化を誘導するためにサイトカインおよびシグナル伝達物質を含有する完全ＲＰＭＩ培地に、所望の濃度（一般的に$10^5$から$10^6$細胞／ｍｌ）で再懸濁した。感染細胞をマルチウェルプレートに分注し、３７℃および５％$CO_2$の組織培養インキュベーターに移した。不死化Ｂ細胞ライブラリーの作製のために、一般的に約$10^7$細胞を、サイトカインおよびシグナル伝達物質を含有する２００ｍｌの培地に再懸濁し、１０枚の丸底９６ウェルプレート中に配置した（約$10^4$細胞／２００μＬ／ウェル）。

【０３１９】

ＴＬＲリガンドの存在下での感染。Ｂ細胞を、感染時にＴｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）リガンドを加えて、上記のようにＢ９５－８株ＥＢＶに感染させた。リガンドは以下の最終濃度で加えた：リポタンパク質Ｐａｍ３ＣＳＫ４（０．５μｇ／ｍｌ）、ザイモサン（１μｇ／ｍｌ）、ポリイノシン、ポリシチジル酸（ポリＩ：Ｃ）（２５μｇ／ｍｌ）、リポ多糖（ＬＰＳ）（５μｇ／ｍｌ）、イミキモド（１μｇ／ｍｌ）、非メチル化ＣｐＧ　ＤＮＡ（１μｇ／ｍｌ）。すべてのＴＬＲリガンド（ＩｎＶｉｖｏＧｅｎ　Ｉｎｃによる）は、Ｄｒ．Ｍｏｈａｍｅｄ　Ｓａｌｅｍ（ＭＵＳＣ）のご厚意により贈与された。

【０３２０】

リンパ芽球様細胞の増生によるＢ細胞不死化効率の評価。感染１２時間後、Ｂ細胞を計数し、９６ウェル丸底プレートのウェル（Ｇｒｅｉｎｅｒ　カタログ番号６５０１８０）に２倍連続希釈で分注し、ウェルの個々の連続する列は、前の列に見出される細胞数の半分を含有した。最初の列は５０，０００細胞／ウェルを含有し、連続希釈の最終列は、２４細胞／ウェルを含有した。細胞を、３７℃および５％$CO_2$の組織培養インキュベーターにおいて９日間インキュベートし、その時点でリンパ芽球様細胞の増生を顕微鏡によって可視化した。不死化効率を、リンパ芽球様細胞の増殖はウェル中の少なくとも１つのＢ細胞のＥＢＶによる不死化からもたらされるという仮説に基づき評価した。したがって、効率を、最も少ない細胞数を有するウェルを含有する列／リンパ芽球様細胞の増殖が顕微鏡によって一貫して観察されたウェルから計算し、１不死化事象／ウェルに元々分注された細胞数として表した。

【０３２１】

フローサイトメトリー分析を、確立された方法に従って、ＭＵＳＣ　Ｆｌｏｗ　Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ　ＦａｃｉｌｉｔｙにおいてＢｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　ＦＡＣＳ　Ｃａｌｉｂｕｒ装置を使用して実施した。ＥＢｆａＶ－ＧＦＰに感染させたＢ細胞の感染効率を、感染２４時間後の緑色蛍光タンパク質の蛍光を測定することによって評価した。ヒトＢ細胞を特徴付けるために使用された抗体は、ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから入手し、ヒトＣＤ２０、ＣＤ１９、ＣＤ２３、ＣＤ２７、ＣＤ３０、ＣＤ３８、ＩｇＤ、ＩｇＭおよびＩｇＧに対して特異的である。

【０３２２】

Ｂ細胞分化およびＩｇＧの分泌の誘導。不死化プロセスの間のＢ細胞分化についてのそれらの効果を決定するために、サイトカインおよび他のシグナル伝達物質を、ＥＢＶ感染Ｂ細胞に、感染後すぐに、または感染後１６から２０時間後のいずれかに加え、１週間間隔でさらに２回加えた。すべての薬剤を完全ＲＰＭＩ培地で希釈し、以下の最終濃度で細胞に加えた：組換えヒトインターロイキン（ＩＬ）ＩＬ－４、０．２ｎｇ／ｍｌ；ＩＬ－５、０．２ｎｇ／ｍｌ；ＩＬ－６、０．１ｎｇ／ｍｌ；ＩＬ－９、０．２ｎｇ／ｍｌ；ＩＬ－１０、２．４ｎｇ／ｍｌ；ＩＬ－１３、１ｎｇ／ｍｌ；組換えヒトインターフェロン－α（ＩＦＮ－α２ａ）、２，０００ＩＵ／ｍｌ；組換えヒトＢＡＦＦ、１ｎｇ／ｍｌ；組換えヒト可溶性ＣＤ４０Ｌ、５ｎｇ／ｍｌ；ヤギ抗ヒトＩｇＭ（Ｆａｂ’）$_2$、１．４μｇ／ｍｌ。ＩＬ－４（カタログ番号２００－０４）、ＩＬ－５（カタログ番号２００－０５）、ＩＬ－６（カタログ番号２００－０６）、ＩＬ－９（カタログ番号２００－０９）、ＩＬ－１０（カタログ番号２００－１０）、ＩＬ－１３（カタログ番号２００－１３）、ＣＤ４０Ｌ（カタログ番号３１０－０２）およびＢＡＦＦ（カタログ番号３１０－１３）は、ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ（Ｒｏｃｋｙ Ｈｉｌｌ、ＮＪ）から入手した。ＩＦＮ－α２ａ（Ｒｏｆｅｒｏｎ（登録商標）－Ａ）は、Ｒｏｃｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓからであり、ヤギ抗ヒトＩｇＭ（Ｆａｂ’）$_2$（カタログ番号１０９－００６－１２９）はＪａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｉｎｃからである。

【０３２３】

ヌクレオリン結合研究に使用する不死化Ｂ細胞レパートリーの作製。扁桃腺または末梢血のＢ細胞を、上記のように、１０×濃縮Ｂ９５－８ウイルスを用いてスピンフェクションにより感染させた。スピンフェクション後すぐに、細胞を完全ＲＰＭＩ培地に再懸濁し、そこにＣＤ４０Ｌ（５ｎｇ／ｍＬ）、ＢＡＦＦ（１ｎｇ／ｍｌ）およびヤギ抗ヒトＩｇＭ（Ｆａｂ’）$_2$（１．４μｇ／ｍｌ）（１２試料に対して）を加えた。全体に、扁桃腺ライブラリーは、サイトカインおよびシグナル伝達物質カクテルを含有する２００ｍｌの培地に再懸濁され、１０枚の丸底９６ウェルプレート（約$10^4$細胞／２００μＬ／ウェル）にプレーティングされた、約$10^7$の感染Ｂ細胞からなった。末梢血ライブラリーを、$10^6$のＢ細胞／２０ｍｌの培地＋カクテルで再懸濁し、丸底９６ウェルプレートに、約$10^4$細胞／２００μＬ／ウェルでプレーティングした。

【０３２４】

ＥＬＩＳＡによるヒト免疫グロブリンＩｇＭおよびＩｇＧの生成の測定。感染後５日に開始して様々な時点で培養上清を回収し、ＩｇＭおよびＩｇＧに関する捕捉ＥＬＩＳＡによる定量的アッセイまで－２０℃で凍結保存した。ＣｏｓｔａｒのＥＩＡ／ＲＩＡ９６ウェルプレートを、ヤギ抗ヒトＩｇＧ ＵＮＬＢまたは抗ヒトＩｇＭ ＵＮＬＢ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ）を用いて、０．０５Ｍの炭酸－重炭酸塩バッファー、ｐＨ９．６中２μｇ／ｍｌで１００μＬ／ウェルを使用してコーティングした。カバーをしたプレートを４℃において一晩インキュベートした。翌日、プレートを、１×ＰＢＳ／０．０５％ Ｔｗｅｅｎ－２０（２００μｌ／ウェル）を用いて４回洗浄し、１×ＰＢＳ／１％ＢＳＡ（３００μｌ／ウェル）を用いて、４５０ｒｐｍで振とうしながら室温において１時間ブロックした。その後、プレートを、１ｘＰＢＳ／０．０５％ Ｔｗｅｅｎ－２０（３５０μｌ／ウェル）を用いて２回洗浄し、試料およびスタンダード（ヒトＩｇＧおよびヒトＩｇＭスタンダード（Ｓｉｇｍａ））を１×ＰＢＳ／１％ＢＳＡで希釈し、プレートに塗布した（１００μｌ／ウェル）。３．９ｎｇ／ｍＬから１０００ｎｇ／ｍＬの範囲の２倍希釈および培地のみの１０点の標準曲線を作成した。その後、プレートを、４５０ｒｐｍで振とうしながら室温において１時間インキュベートした。洗浄後、プレートを、２００μｌ／ウェルの１×ＰＢＳ／０．０５％ Ｔｗｅｅｎ－２０を用いて４回洗浄し、その後検出抗体を加えた（ヤギ抗ヒトＩｇＧまたはＩｇＭ ＡＰ－コンジュゲート（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ ＃２０４０－０４または２０２０－０４）、１×ＰＢＳ／１％ＢＳＡ（１００μｌ／ウェル）で１：４０００に希釈）。プレートを、４５０ｒｐｍで振とうしながら室温において１時間インキュベートした。洗浄後、発色基質のｐ－ニト

ロフェニルリン酸二ナトリウム塩（ＰＮＰＰ、Ｐｅｉｒｃｅ　カタログ番号３７６２０）のＡＰ変換を、Ｍｕｌｔｉｓｋａｎ　Ｓｐｅｃｔｒｕｍプレートリーダー（ＴｈｅｒｍｏＬａｂｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して、$ＯＤ_{405}$における吸光度を測定することによって検出した。培養上清試料中のヒト免疫グロブリンのレベルを、精製ヒトＩｇＧおよびＩｇＭのスタンダードの標準較正曲線に従って、ＭｕｌｔｉＳｋａｎソフトウェアを使用して計算した。

【０３２５】

ヌクレオリン結合ＥＬＩＳＡ。組換えヌクレオリン結合に関するＥＬＩＳＡによるスクリーニングを、Ｃａ／Ｍｇ非含有の１×ダルベッコＰＢＳ中組換えヌクレオリン（０．５～２μｇ／ｍｌ）を用いて、４℃において一晩、プレートをコーティングすることによって実施した。翌日、プレートを１×ＰＢＳ／０．０５％　Ｔｗｅｅｎ－２０（３００μＬ／ウェル）を用いて３回洗浄し、２．５ｍＭ　Ｔｒｉｓ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４中１×ＳｕｐｅｒＢｌｏｃｋ　ｐｒｏｔｅｉｎ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　＃３７５４５）を用いて、４５０ｒｐｍで振とうしながら室温において１時間ブロックした。洗浄後、ブロッキングバッファーで１：１００に希釈した対照のマウス抗ヌクレオリンＭＳ－３　ＭＡｂ（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ．　＃ｓｃ－８０３１）または抗ヌクレオリン抗体（そのまま、１００μＬ／ウェル）を含有するＢ細胞培養上清のいずれかからなる一次抗体を加えた。４５０ｒｐｍで振とうしながら室温において２時間インキュベーション後、プレートを洗浄し、培養上清のための、ブロッキングバッファーで１：５０００に希釈して使用したヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＨＲＰ　ＭＡｂ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ、＃２０４０－０５）またはＭＳ３のために、対照のマウスＭＳ３　ＭＡｂの検出のための、ブロッキングバッファーで１：２０００に希釈して使用したヤギ抗マウスＩｇＧ－ＨＲＰ　ＭＡｂ（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ．＃ｓｃ－２０５５）のいずれかからなる検出抗体を加えた。プレートを、１００μＬ／ウェルで使用したＴＭＢ＋色素原（Ｄａｋｏ、Ｄｅｎｍａｒｋ　Ｓ１５９９）を使用して発色させ、分光光度法によって$ＯＤ_{450}$の吸光度において定量化した。

【０３２６】

組換えヒトヌクレオリンタンパク質の生成および単離。Ｅ．ｃｏｌｉを、残基２８４～７０７および６ヒスチジンをコードする、切断型ヌクレオリン遺伝子［ｐＥＴ　Δ１－２８３　Ｎｕｃ－$（Ｈｉｓ）_{6}$］（Ｙａｎｇら、２００２年）を担持する組換えｐＥＴ２１ａプラスミドを用いて形質転換し、超音波処理によって溶解した。先に記載のように、組換えヒトヌクレオリンを作製し、精製した（Ｓｅｎｇｕｐｔａら、２００４年）。簡潔に言うと、Ｅ．ｃｏｌｉをＡ６００＝０．６まで培養し、その後、０．４ｍＭのイソプロピル－１－チオ－β－Ｄ－ガラクトピラノシドを用いて、３０℃において一晩誘導した。誘導後、細胞ペレットをバッファーＡ（２０ｍＭのリン酸ナトリウムバッファー、ｐＨ７．４、５００ｍＭのＮａＣｌ、１０ｍＭのイミダゾール、１ｍＭのフッ化フェニルメチルスルホニル）に再懸濁し、超音波処理によって溶解した。溶解液を、１２，０００ｇで３０分間遠心分離にかけた。上清を、バッファーＡを用いて平衡化し、洗浄した、１．７ｍｌの金属キレート（ＰＯＲＯＳ　ＭＣ－Ｍ）カラム（ＢｉｏＣＡＤ　ＳＰＲＩＮＴかん流クロマトグラフィーシステム）上に装填し、その後、バッファーＣ中の０～２００ｍＭのイミダゾールの直線勾配を用いて溶出した。透析によりイミダゾールを除去し、タンパク質をＭｉｃｒｏｃｏｎコンセントレーターにおいて濃縮した。タンパク質濃度をＢｒａｄｆｏｒｄアッセイによって測定し、タンパク質純度をＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析によって評価した。

【０３２７】

ＭＶ４－１１細胞由来の内因性ヌクレオリンの単離。ヒトヌクレオリン・アフィニティーカラムを、製造業者の指示書に従って、マウス抗ヒトヌクレオリンＭＡｂ　ＭＳ－３（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）と、Ｕｌｔｒａｌｉｎｋ　Ｂｉｏｓｕｐｐｏｒｔ　ｍｅｄｉｕｍ（Ｐｉｅｒｃｅ）とをカップリングすることによって作製した。簡潔に言うと、１ｍｇ

のＭＳ－３　ＭＡｂを、０．１Ｍの炭酸バッファー、ｐＨ９．０に対して透析し、クエン酸ナトリウムを、最終濃度０．６Ｍになるように加えた。乾燥ビーズ（０．２５ｇ）を加え、ＲＴにおいて２時間混合し、カラムに注ぎ、ＰＢＳを用いて洗浄した。溶出液および洗浄液を回収し、カップリング効率を決定し、これは通常約９４％である。６ｍｌの３Ｍのエタノールアミン、ｐＨ９．０をカラムに加え、残りの結合部位をブロックし、その後カラムを両方の末端で閉鎖し、室温で２．５時間、回転させて混合した。次いで、カラムを、ＰＢＳ、１ＭのＮａＣｌ、その後ＰＢＳで連続して洗浄し、ＭＶ４－１１細胞抽出液を装填した。細胞抽出液を作るために、ＭＶ４－１１細胞をＰＢＳで洗浄し、ペレット化し、プロテアーゼおよびホスファターゼの阻害剤を含有する溶解バッファーに再懸濁し、氷上で１５分間インキュベートした。溶解液を、１０，０００ｇで２０分間遠心分離にかけ、上清を、ＭＳ－３　ＭＡｂアフィニティーカラム上に装填した。カラムを、２０倍量のＴｒｉｓ－バッファー（ｐＨ　７．５）を用いて洗浄し、結合したタンパク質を、抗原／抗体溶出バッファー（Ｐｉｅｒｃｅ）を用いて溶出した。１ｍｌ分画を回収し、ＰＤ１０カラムを使用して脱塩した。タンパク質分画を濃縮し、ＳＤＳ－ｐａｇｅにより分析し、その後銀染色法およびＭＳ－３抗ヌクレオリンＭＡｂを用いたウェスタンブロッティングを実施した。

【０３２８】

クローン５Ｄ１。初期スクリーニングおよび一次サブクローニング。扁桃腺試料を受理し、５×９６ウェルプレートに処理した：レパートリー（Ｔ０３１００９）。プレートプールを、プレートプールおよびウェルプール（Ｐ０３１１０９およびＴ０３１００９の組合せに関するウェルプール）に関してスクリーニングした。推定の陽性ウェル（Ｔ０３１００９－５Ｄ１および－５Ｇ５、Ｐ０３０９０９－３Ｄ１および－３Ｇ５）を、それぞれ１ウェルから３ウェルに増殖させた。ＥＬＩＳＡによる確認を実施し、反応性ウェル（Ｔ０３１００９－５Ｄ１およびＰ０３１１０９－３Ｇ５）を特定した。このウェルを、１プレートの１０００細胞／ウェルおよび２プレートの１００細胞／ウェルにサブクローニングした。

【０３２９】

二次サブクローニング。３つのサブクローニングプレート（１×１０００細胞／ウェルおよび２×１００細胞／ウェル）を、単一プレートプールとしてスクリーニングし、反応度はなく、再スクリーニングした。反応性ウェルを確認した。Ｔ０３１００９－５Ｄ１のウェル１Ｅ７および１Ｇ７が最も高い反応度を有し、個別の９６－ウェルプレート上の６０ウェルにそれぞれサブクローニングした。

【０３３０】

三次サブクローニング。２つのサブクローニングプレート（Ｔ０３１００９－５Ｄ１－１Ｅ７およびＴ０３１００９－５Ｄ１－１Ｇ７）を、単一のプレートプールとして３回スクリーニングし、反応度がなかったが、陽性対照のマウスモノクローナル抗体（ＭＳ－３）もまた非反応性であり、ヌクレオリン抗原が分解され、不運にも、さらなるスクリーニングのためには残っていないことが示された。プレートを２回分割し、過剰な細胞を別々にプールし、増生させ、アリコートを凍結させた。プレートプールおよび増生複製プールを、非分解ヌクレオリンの新しいストックに対して再試験した。ウェル１Ｃ１１および１Ｇ２（両方ともＴ０３１００９－５Ｄ１－１Ｇ７に由来する）は弱い反応性であり、サブクローニング用に選択された。

【０３３１】

四次サブクローニング。２つのサブクローニングプレートを、プレートプールとして２週間後にスクリーニングし、反応度がなく、１週間後に再スクリーニングし、複数のウェルにおいて弱い反応度が示された。個別のウェルをスクリーニングし、Ｔ０３１００９－５Ｄ１－１Ｇ７のウェル１Ｆ１０および１Ｇ２が、最も高い反応度を有し、個別の９６ウェルプレート上の６０ウェルにそれぞれサブクローニングした。

【０３３２】

第５ラウンドのサブクローニング。サブクローニングプレートを、単一のカラムプール

として２週間後にスクリーニングし、それぞれ１および２ウェルにおいて非常に反応度が弱く、１週間後に再スクリーニングし、その２日後に全部のプレートプールを再スクリーニングし、個別のウェルを２日後に確認した。Ｔ０３１００９－５Ｄ１－１Ｇ７－１Ｆ１０のウェル１Ｄ１０が最も高い反応度を有し、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３３３】

第６ラウンドのサブクローニング。サブクローニングプレートを、個別のカラムプールとして１６日後にスクリーニングし、反応性ウェルが３つ存在した。全プレートのスクリーニングを４日後に実施し、Ｔ０３１００９－５Ｄ１－１Ｇ７－１Ｆ１０－１Ｄ１０のウェル１Ｂ４が最も高い反応度を有し、２日後に単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３３４】

第７ラウンドのサブクローニング。サブクローニングプレートを、個別のカラムプールとして１７日後にスクリーニングし、反応度がなく、１０日後に再スクリーニングし、４ウェルにおいて中程度の反応度および他の２つのウェルにおいて弱い反応度があった。全プレートのスクリーニングを２日後に実施し、Ｔ０３１００９－５Ｄ１－１Ｇ７－１Ｆ１０－１Ｄ１０－１Ｂ４のウェル１Ｃ７が最も高い反応度を有し、２日後に単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。残りの反応性ウェルをプールし、増殖させ、－８０℃において凍結した（Ｔ０３１００９－５Ｄ１－１Ｇ７－１Ｆ１０－１Ｄ１０－１Ｂ４）。

【０３３５】

第８ラウンドのサブクローニング。３週間後、サブクローニングプレートを、個別のカラムプールとしてスクリーニングし、６ウェルすべてが中程度に反応性であった。全プレートのスクリーニングを実施し、多数の強い、または中程度に反応性のウェルが存在した。Ｔ０３１００９－５Ｄ１－１Ｇ７－１Ｆ１０－１Ｄ１０－１Ｂ４－１Ｃ７のウェル１Ｇ１０が最も高い反応度を有し、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。残りの反応性ウェルをプールした。１１日後、サブクローニングプレートが真菌の混入の証拠を示し、廃棄した。プールした残り由来の反応性細胞（Ｔ０３１００９－５Ｄ１－１Ｇ７－１Ｆ１０－１Ｄ１０－１Ｂ４－１Ｃ７）を増殖させ、４日後に、１０枚の９６ウェルプレートにサブクローニングした。２週間後、これらのサブクローニングプレートをスクリーニングし、Ｔ０３１００９－５Ｄ１－１Ｇ７－１Ｆ１０－１Ｄ１０－１Ｂ４－１Ｃ７のウェル８Ｂ９および８Ｅ１０が最も高いヌクレオリン反応性を有し、翌日、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。９日後、サブクローニングプレートが、再度真菌の混入の証拠を示し、廃棄した。凍結プールしたＴ０３１００９－５Ｄ１－１Ｇ７－１Ｆ１０－１Ｄ１０－１Ｂ４細胞を解凍し、増殖させ、１０日後に５枚の９６ウェルプレートにサブクローニングした。２週間後、プレートを、ヌクレオリン反応性に関してスクリーニングし、翌日、Ｔ０３１００９－５Ｄ１－１Ｇ７－１Ｆ１０－１Ｄ１０－１Ｂ４のウェル２Ｅ３および４Ｃ９が陽性であることを確認し、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。１０日後、プレートを、ヌクレオリン反応性に関してスクリーニングし、Ｔ０３１００９－５Ｄ１－１Ｇ７－１Ｆ１０－１Ｄ１０－１Ｂ４－２Ｅ３のウェル２Ｄ１０および２Ｇ５が最も高い反応性を有し、翌日、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３３６】

第９ラウンドのサブクローニング。１７日後、サブクローニングプレートを、ヌクレオリン反応性に関してスクリーニングし、Ｔ０３１００９－５Ｄ１－１Ｇ７－１Ｆ１０－１Ｄ１０－１Ｂ４－２Ｅ３－２Ｄ１０のウェル１Ｆ７が最も高い反応性を有し、翌日、限界希釈クローニングによって、１０枚の９６ウェルプレートにサブクローニングした。クローン性コロニーが時間と共にゆっくりと現れ、４から６週間の間にヌクレオリン反応度に関してスクリーニングした。３つのウェル（６Ｇ１０、２Ｆ８、６Ｂ３）が反応性を有し

た。クローンＴ０３１００９－５Ｄ１－１Ｇ７－１Ｆ１０－１Ｄ１０－１Ｂ４－２Ｅ３－２Ｄ１０－１Ｆ７－６Ｂ３を、その優れた成長特性のために、機能的抗体試験のために増殖させた。

【０３３７】

クローン３Ｈ１１。初期スクリーニングおよび一次サブクローニング。ボランティアの末梢血試料を受理し、５×９６ウェルプレートに処理した：レパートリー（Ｐ０３１１０９）。プレートプールおよびウェルプールに関してスクリーニングした（Ｐ０３１１０９およびＴ０３１００９を組み合わせたウェルプール）。推定の陽性ウェル（Ｔ０３１００９－５Ｄ１および－５Ｇ５、Ｐ０３１１０９－３Ｄ１および－３Ｇ５）を、それぞれ１ウェルから３ウェルに増殖させ、Ｐ０３１１０９－３Ｇ５を反応性ウェルとして特定した。これを、１プレートの５００細胞／ウェルおよび２プレートの５０細胞／ウェルにサブクローニングした。

【０３３８】

二次サブクローニング。３つのサブクローニングプレート（１×５００細胞／ウェルおよび２×５０細胞／ウェル）を、単一プレートプールとして反応性に関してスクリーニングし、反応度がなかった。プレートプールを再スクリーニングした。反応性ウェルを確認し、Ｐ０３１１０９－３Ｇ５のウェル１Ｄ９および１Ｄ１１が最も高い反応度を有し、単一の９６－ウェルプレート上の６０ウェルにそれぞれサブクローニングした。

【０３３９】

三次サブクローニング、損失および回収。２つのサブクローニングプレート（Ｐ０３１１０９－３Ｇ５－１Ｄ９およびＰ０３１１０９－３Ｇ５－１Ｄ１１）を、単一プレートプールとして２回スクリーニングし、反応度がなかったが、陽性対照のマウスモノクローナル抗体（ＭＳ－３）もまた非反応性であり、ヌクレオリン抗原が分解され、不運にも、さらなるスクリーニングのためには残っていないことが示唆された。プレートを２回分割し、過剰な細胞を別々にプールし、増生させ、アリコートを凍結させた。プレートプールおよび増生複製プールを、非分解ヌクレオリンの新しいストックに対して試験した。元のサブクローニングプレートは反応度を失っていたが、増生複製上清を試験し、陽性であった。Ｐ０３１１０９－３Ｇ５－１Ｄ９から増殖したこれらの細胞を、１０×９６－ウェルプレートにサブクローニングし、培養した。

【０３４０】

四次サブクローニング。１０枚のサブクローニングプレート（Ｐ０３１１０９－３Ｇ５－１Ｄ９）を、単一のプレートプールとしてスクリーニングし、反応性は乏しかった。プレートプール上清を再スクリーニングし、反応度は弱かった。個別のウェルを試験した。Ｐ０３１１０９－３Ｇ５－１Ｄ９のウェル３Ｈ１１が、最も高い反応度を有し、単一の９６－ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３４１】

第５ラウンドのサブクローニング。サブクローニングプレートを単一のカラムプールとしてスクリーニングし、反応度は全くなく、２つの陽性ウェルを再スクリーニングした。全プレートのスクリーニングを実施した。Ｐ０３１１０９－３Ｇ５－１Ｄ９－３Ｈ１１のウェル１Ｆ８が、最も高い反応度を有し、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３４２】

第６ラウンドのサブクローニング。サブクローニングプレートを、個別のカラムプールとしてスクリーニングし、４ウェルが反応度を示した。全プレートのスクリーニングを実施し、Ｐ０３１１０９－３Ｇ５－１Ｄ９－３Ｈ１１－１Ｆ８のウェル１Ｃ７が、最も高い反応度を有し、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３４３】

第７ラウンドのサブクローニング。サブクローニングプレートを、カラムプールとしてスクリーニングし、２つのウェルにおいて弱い反応度があった。再スクリーニングを実施し、５つのウェルにおいて中程度の反応度があった。全部のプレートのスクリーニングを

実施し、Ｐ０３１１０９－３Ｇ５－１Ｄ９－３Ｈ１１－１Ｆ８－１Ｃ７のウェル１Ｆ８が最も高い反応度を有し、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。残りの反応性ウェルをプールし、増殖させ、－８０℃において凍結した（Ｐ０３１１０９－３Ｇ５－１Ｄ９－３Ｈ１１－１Ｆ８－１Ｃ７）。

【０３４４】

第８ラウンドのサブクローニング。サブクローニングプレートを、個別のカラムプールとしてスクリーニングし、２つのウェルが強度に反応性であり、４つのウェルが中程度に反応性であった。全部のプレートのスクリーニングを実施し、複数のウェルが強く反応性であった。Ｐ０３１１０９－３Ｇ５－１Ｄ９－３Ｈ１１－１Ｆ８－１Ｃ７－１Ｆ８のウェル１Ｃ３が、最も高い反応度を有し、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。残りの反応性ウェルをプールした。１１日後、サブクローニングしたプレートが、真菌の混入の証拠を示し、廃棄した。プールした残りの反応性細胞（Ｐ０３１１０９－３Ｇ５－１Ｄ９－３Ｈ１１－１Ｆ８－１Ｃ７－１Ｆ８）を増殖させ、７日後に、１０枚の９６ウェルプレートにサブクローニングした。２週間後、これらのサブクローニングプレートをスクリーニングし、Ｐ０３１１０９－３Ｇ５－１Ｄ９－３Ｈ１１－１Ｆ８－１Ｃ７－１Ｆ８のウェル８Ｂ９および８Ｅ１０が最も高いヌクレオリン反応度を有し、翌日、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。９日後、サブクローニングプレートが、再度真菌の混入の証拠を示し、廃棄した。凍結プールしたＰ０３１１０９－３Ｇ５－１Ｄ９－３Ｈ１１－１Ｆ８－１Ｃ７細胞を解凍し、増殖させ、１０日後に５枚の９６ウェルプレートにサブクローニングした。２週間後、プレートを、ヌクレオリン反応度に関してスクリーニングし、翌日、Ｐ０３１１０９－３Ｇ５－１Ｄ９－３Ｈ１１－１Ｆ８－１Ｃ７のウェル２Ｄ２および２Ｇ９が陽性であることを確認し、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。１０日後、プレートを、ヌクレオリン反応度に関してスクリーニングし、Ｐ０３１１０９－３Ｇ５－１Ｄ９－３Ｈ１１－１Ｆ８－１Ｃ７－２Ｇ９のウェル２Ｅ４および２Ｇ３が最も高い反応度を有し、翌日、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３４５】

第９ラウンドのサブクローニング。１７日後、サブクローニングプレートを、ヌクレオリン反応度に関してスクリーニングし、Ｐ０３１１０９－３Ｇ５－１Ｄ９－３Ｈ１１－１Ｆ８－１Ｃ７－２Ｇ９－２Ｅ４のウェル１Ｂ９が最も高いヌクレオリン反応度を有し、翌日、限界希釈クローニングによって、１０枚の９６ウェルプレートにサブクローニングした。クローン性コロニーが時間と共にゆっくりと現れ、４から６週間の間にヌクレオリン反応度に関してスクリーニングした。４つのウェル（８Ｄ２、３Ｆ３、２Ｃ６、９Ｂ７）が反応度を有した。クローンＰ０３１１０９－３Ｇ５－１Ｄ９－３Ｈ１１－１Ｆ８－１Ｃ７－２Ｇ９－２Ｅ４－１Ｂ９－２Ｃ６を、その優れた成長特性のために、機能的抗体試験のために増殖させた。

【０３４６】

クローン２Ｄ３。初期スクリーニングおよび一次サブクローニング。扁桃腺試料を受理し、１０×９６ウェルプレートに処理した：レパートリー（Ｔ０３１６０９Ａ）。１１日後、これらを、プレートプールおよびウェルプールに関してスクリーニングした。３日後、ＥＬＩＳＡによる確認を実施し、反応性ウェル（Ｔ０３１６０９Ａ－２Ｄ３）を特定し、１プレートの１０００細胞／ウェルおよび２プレートの１００細胞／ウェルに、２日後サブクローニングした。

【０３４７】

二次サブクローニング。３つのサブクローニングプレート（１×１０００細胞／ウェルおよび２×１００細胞／ウェル）を、単一プレートプールとしてスクリーニングし、反応度がなく、１週間後再スクリーニングした。反応性ウェルを確認した。Ｔ０３１６０９Ａ－２Ｄ３のウェル１Ｃ７および１Ｅ３が最も高い反応度を有し、個別の９６ウェルプレート上の６０ウェルにそれぞれサブクローニングした。

【０３４８】
三次サブクローニング。２つのサブクローニングプレート（Ｔ０３１６０９Ａ－２Ｄ３－１Ｃ７およびＴ０３１６０９Ａ－２Ｄ３－１Ｅ３）を、単一のプレートプールとしてスクリーニングし、繰り返し、反応度がなかったが、陽性対照のマウスモノクローナル抗体（ＭＳ－３）もまた非反応性であり、ヌクレオリン抗原が分解され、不運にも、さらなるスクリーニングのためには残っていないことが示された。プレートを２回分割し、過剰な細胞を別々にプールし、増生させ、アリコートを凍結させた。プレートプールおよび増生複製プールを、非分解ヌクレオリンの新しいストックに対して試験した。反応性ウェル１Ｆ４（Ｔ０３１６０９Ａ－２Ｄ３－１Ｃ７に由来する）を選択し、サブクローニングした。

【０３４９】
四次サブクローニング。サブクローニング上清（Ｔ０３１６０９Ａ－２Ｄ３－１Ｃ７－１Ｆ４）をスクリーニングし、反応度がなく、再スクリーニングし、弱い反応度があった。ウェル１Ｂ１１および１Ｆ３が最も高い反応度を有し、サブクローニングのために選択した。それぞれのウェルを、個別の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３５０】
第５ラウンドのサブクローニング。サブクローニングプレートを、単一のカラムプールとしてスクリーニングし、反応度がなく、再スクリーニングし、プレートプールを再スクリーニングし、確認を実施した。プレートＴ０３１６０９Ａ－２Ｄ３－１Ｃ７－１Ｆ４－１Ｂ１１に由来するウェル１Ｃ９が最も高い反応度を有し、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３５１】
第６ラウンドのサブクローニング。サブクローニングプレートを、個別のカラムプールとしてスクリーニングし、３つのウェルが反応度を示した。全プレートのスクリーニングを実施し、Ｔ０３１６０９Ａ－２Ｄ３－１Ｃ７－１Ｆ４－１Ｂ１１－１Ｃ９のウェル１Ｇ６が、最も高い反応度を有し、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３５２】
第７ラウンドのサブクローニング。サブクローニングプレートを、個別のカラムプールとしてスクリーニングし、１ウェルにおいて弱い反応度があった。再スクリーニングを実施し、２つのウェルにおいて中程度の反応度があった。全部のプレートのスクリーニングを実施し、Ｔ０３１６０９Ａ－２Ｄ３－１Ｃ７－１Ｆ４－１Ｂ１１－１Ｃ９－１Ｇ６のウェル１Ｅ１０が、最も高い反応度を有し、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。残りの反応性ウェルをプールし、増殖させ、－８０℃において凍結した（Ｔ０３１６０９Ａ－２Ｄ３－１Ｃ７－１Ｆ４－１Ｂ１１－１Ｃ９－１Ｇ６）。

【０３５３】
第８ラウンドのサブクローニング。サブクローニングプレートを、個別のカラムプールとしてスクリーニングし、４つの反応性ウェルがあった。全部のプレートのスクリーニングを実施し、中程度の反応度があった。Ｔ０３１６０９Ａ－２Ｄ３－１Ｃ７－１Ｆ４－１Ｂ１１－１Ｃ９－１Ｇ６－１Ｅ１０のウェル１Ｆ３が最も高い反応度を有し、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。残りの反応性ウェルをプールした。１１日後、サブクローニングしたプレートが真菌の混入の証拠を示し、廃棄した。プールした残りの反応性細胞（Ｔ０３１６０９Ａ－２Ｄ３－１Ｃ７－１Ｆ４－１Ｂ１１－１Ｃ９－１Ｇ６－１Ｅ１０）を増殖させ、７日後に、１０枚の９６ウェルプレートにサブクローニングした。２週間後、これらのサブクローニングプレートをスクリーニングし、Ｔ０３１６０９Ａ－２Ｄ３－１Ｃ７－１Ｆ４－１Ｂ１１－１Ｃ９－１Ｇ６－１Ｅ１０のウェル１０Ｆ７および１０Ｇ７が最も高いヌクレオリン反応度を有し、翌日、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。９日後、クローニングしたプレートが、再度真菌の混入の証拠を示し、廃棄した。凍結プールしたＴ０３１６０９

Ａ－２Ｄ３－１Ｃ７－１Ｆ４－１Ｂ１１－１Ｃ９－１Ｇ６細胞を解凍し、増殖させ、１０日後に５枚の９６ウェルプレートにサブクローニングした。２週間後、プレートを、ヌクレオリン反応度に関してスクリーニングし、翌日、Ｔ０３１６０９Ａ－２Ｄ３－１Ｃ７－１Ｆ４－１Ｂ１１－１Ｃ９－１Ｇ６のウェル１Ｂ６および５Ｆ４が陽性であることを確認し、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。１０日後、プレートを、ヌクレオリン反応度に関してスクリーニングし、Ｔ０３１６０９Ａ－２Ｄ３－１Ｃ７－１Ｆ４－１Ｂ１１－１Ｃ９－１Ｇ６－５Ｆ４のウェル２Ｆ１０および２Ｇ６が最も高い反応度を有し、翌日、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３５４】

第９ラウンドのサブクローニング。１７日後、サブクローニングプレートを、ヌクレオリン反応度に関してスクリーニングし、Ｔ０３１６０９Ａ－２Ｄ３－１Ｃ７－１Ｆ４－１Ｂ１１－１Ｃ９－１Ｇ６－５Ｆ４－２Ｆ１０のウェル１Ｄ８が最も高いヌクレオリン反応度を有し、翌日、限界希釈クローニングによって、１０枚の９６ウェルプレートにサブクローニングした。クローン性コロニーが時間と共にゆっくりと現れ、４から６週間の間にヌクレオリン反応度に関してスクリーニングした。３つのウェル（９Ｄ７、２Ａ１２、３Ｅ４）が反応度を有した。クローンＴ０３１６０９Ａ－２Ｄ３－１Ｃ７－１Ｆ４－１Ｂ１１－１Ｃ９－１Ｇ６－５Ｆ４－２Ｆ１０－１Ｄ８－２Ａ１２を、その優れた成長特性のために、機能的抗体試験のために増殖させた。

【０３５５】

クローン７Ｇ７。初期スクリーニングおよび一次サブクローニング。扁桃腺試料を受理し、１０×９６ウェルプレートに処理した：レパートリー（Ｔ０３１６０９Ｂ）。これらを、プレートプールおよびウェルプールに関してスクリーニングした。ＥＬＩＳＡによる確認を実施し、反応性ウェルＴ０３１６０９Ｂ－１Ｈ９を特定し、これを３つのプレートにサブクローニングした（１プレートの１０００細胞／ウェルおよび２プレートの１００細胞／ウェル）。

【０３５６】

二次サブクローニング。３つのサブクローニングプレート（１×１０００細胞／ウェルおよび２×１００細胞／ウェル）を、単一のプレートプールとしてスクリーニングし、反応度がなく、その後再スクリーニングした。反応性ウェルを確認した。Ｔ０３１６０９Ｂ－１Ｈ９のウェル１Ｇ２および１Ｇ９が最も高い反応度を有し、個別の９６ウェルプレート上の６０ウェルにそれぞれサブクローニングした。

【０３５７】

三次サブクローニング、損失および回収。２つのサブクローニングプレート（Ｔ０３１６０９Ｂ－１Ｈ９－１Ｇ２およびＴ０３１６０９Ｂ－１Ｈ９－１Ｇ９）を、単一のプレートプールとして３回スクリーニングし、反応度がなかったが、陽性対照のマウスモノクローナル抗体（ＭＳ－３）もまた非反応性であり、ヌクレオリン抗原が分解され、不運にも、さらなるスクリーニングのためには残っていないことが示された。プレートを２回分割し、過剰な細胞を別々にプールし、増生させ、アリコートを凍結させた。プレートプールおよび増生複製プールを、非分解ヌクレオリンの新しいストックに対して試験したが、非反応性であった。Ｔ０３１６０９Ｂ－１Ｈ９－１Ｇ２由来の凍結アリコートを、０６－０３－０９において解凍し、再培養のために１０×９６ウェルプレートにプレーティングした。

【０３５８】

四次サブクローニング。１０枚のサブクローニングプレート（Ｔ０３１６０９Ｂ－１Ｈ９－１Ｇ２）を、カラムプールとしてスクリーニングし、反応度はなかった。１０枚のプールしたプレート由来の上清を、再スクリーニングし、反応度は弱かった。個別のウェルを試験した。Ｔ０３１６０９Ｂ－１Ｈ９－１Ｇ２ウェル７Ｇ７が、最も高い反応度を有し、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３５９】

第５ラウンドのサブクローニング。サブクローニングプレートを、単一のカラムプールとしてスクリーニングし、反応度が全くなく、その後再スクリーニングし、１つの反応性ウェルがあった。全プレートプールを再スクリーニングし、Ｔ０３１６０９Ｂ－１Ｈ９－１Ｇ２－７Ｇ７のウェル１Ｂ９が最も高い反応度を有し、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３６０】

第６ラウンドのサブクローニング。サブクローニングプレートを、個別のカラムプールとしてスクリーニングし、２つの反応性ウェルがあった。全プレートのスクリーニングを実施し、Ｔ０３１６０９Ｂ－１Ｈ９－１Ｇ２－７Ｇ７－１Ｂ９のウェル１Ｄ６が最も高い反応度を有し、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３６１】

第７ラウンドのサブクローニング。サブクローニングプレートを、カラムプールとしてスクリーニングし、４つのウェルにおいて反応度が弱く、再スクリーニングし、４つのウェルにおいて中程度の反応度があった。全部のプレートのスクリーニングを実施し、Ｔ０３１６０９Ｂ－１Ｈ９－１Ｇ２－７Ｇ７－１Ｂ９－１Ｄ６のウェル１Ｅ３が、最も高い反応度を有し、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。残りの反応性ウェルをプールし、増殖させ、－８０℃において凍結した（Ｔ０３１６０９Ｂ－１Ｈ９－１Ｇ２－７Ｇ７－１Ｂ９－１Ｄ６）。

【０３６２】

第８ラウンドのサブクローニング。サブクローニングプレートを、個別のカラムプールとしてスクリーニングし、５つの中程度に反応性のウェルがあった。全部のプレートのスクリーニングを実施し、複数の中程度の反応度があった。Ｔ０３１６０９Ｂ－１Ｈ９－１Ｇ２－７Ｇ７－１Ｂ９－１Ｄ６－１Ｅ３のウェル１Ｄ９が、最も高い反応度を有し、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。残りの反応性ウェルをプールした。１１日後、サブクローニングしたプレートが真菌の混入の証拠を示し、廃棄した。プールした残りの反応性細胞（Ｔ０３１６０９Ｂ－１Ｈ９－１Ｇ２－７Ｇ７－１Ｂ９－１Ｄ６－１Ｅ３）を増殖させ、７日後に、１０枚の９６ウェルプレートにサブクローニングした。２週間後、これらのサブクローニングプレートをスクリーニングし、Ｔ０３１６０９Ｂ－１Ｈ９－１Ｇ２－７Ｇ７－１Ｂ９－１Ｄ６－１Ｅ３のウェル３Ｇ１０および３Ｇ１１が最も高いヌクレオリン反応度を有し、翌日、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。９日後、クローニングしたプレートが、再度真菌の混入の証拠を示し、廃棄した。凍結プールしたＴ０３１６０９Ｂ－１Ｈ９－１Ｇ２－７Ｇ７－１Ｂ９－１Ｄ６細胞を解凍し、増殖させ、１０日後に５枚の９６ウェルプレートにサブクローニングした。２週間後、プレートを、ヌクレオリン反応度に関してスクリーニングし、翌日、Ｔ０３１６０９Ｂ－１Ｈ９－１Ｇ２－７Ｇ７－１Ｂ９－１Ｄ６のウェル３Ｄ９および４Ｂ７が陽性であることを確認し、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。１０日後、プレートを、ヌクレオリン反応度に関してスクリーニングし、Ｔ０３１６０９Ｂ－１Ｈ９－１Ｇ２－７Ｇ７－１Ｂ９－１Ｄ６－４Ｂ７のウェル２Ｃ１０および２Ｆ１１が最も高い反応度を有し、翌日、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３６３】

第９ラウンドのサブクローニング。１７日後、サブクローニングプレートを、ヌクレオリン反応度に関してスクリーニングし、Ｔ０３１６０９Ｂ－１Ｈ９－１Ｇ２－７Ｇ７－１Ｂ９－１Ｄ６－４Ｂ７－２Ｆ１１のウェル２Ｅ６が最も高いヌクレオリン反応度を有し、翌日、限界希釈クローニングによって、１０枚の９６ウェルプレートにサブクローニングした。クローン性コロニーが時間と共にゆっくりと現れ、４から６週間の間にヌクレオリン反応度に関してスクリーニングした。４つのウェル（２Ｂ９、７Ｆ２、１Ｃ４、１０Ｇ１１）が反応度を有した。クローンＴ０３１６０９Ｂ－１Ｈ９－１Ｇ２－７Ｇ７－１Ｂ９－１Ｄ６－４Ｂ７－２Ｆ１１－２Ｅ６－７Ｆ２を、その優れた成長特性のために、機能的抗体試験のために増殖させた。

【０３６４】
クローン２Ｈ３。初期スクリーニングおよび一次サブクローニング。２つの扁桃腺試料を受理し、プールし、１０×９６ウェルプレートからなる単一のレパートリーに処理した（Ｔ０６０８０９）。１０日後、これを、プレートプールおよびウェルプールに関してスクリーニングした。翌日、ＥＬＩＳＡによる確認スクリーニングを実施し、反応性ウェルＴ０６０８０９－２Ｈ３を特定し、３日後に、単一プレートの６０ウェルにサブクローニングした。

【０３６５】
二次サブクローニング。サブクローニングプレートを、単一のカラムプールとしてスクリーニングし、実質的な反応度はなく、カラムプールを再スクリーニングし、全プレートを再スクリーニングした。Ｔ０６０８０９－２Ｈ３のウェル１Ｂ８および１Ｅ７が最も高い反応度を有し、個別の９６ウェルプレート上の６０ウェルにそれぞれサブクローニングした。

【０３６６】
三次サブクローニング。サブクローニングプレートを、個別のカラムプールとしてスクリーニングし、反応度を示す複数のウェルがあった。全プレートのスクリーニングを実施した。反応性ウェルＴ０６０８０９－２Ｈ３－１Ｂ８　１Ｃ１０およびＴ０６０８０９－２Ｈ３－１Ｅ７　１Ｆ５が最も高い反応度を有し、個別の９６ウェルプレート上の６０ウェルにそれぞれサブクローニングした。

【０３６７】
四次サブクローニング。サブクローニングプレートを、個別のカラムプールとしてスクリーニングし、Ｔ０６０８０９－２Ｈ３－１Ｂ８－１Ｃ１０に関して複数の反応性ウェルがあった。全プレートのスクリーニングを実施し、ウェル１Ｆ９が、最も高い反応度を有し、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。残りの反応性ウェルをプールし、増殖させ、－８０℃において凍結した（Ｔ０６０８０９－２Ｈ３－１Ｂ８－１Ｃ１０）。

【０３６８】
第５ラウンドのサブクローニング。サブクローニングプレーを、個別のカラムプールとしてスクリーニングし、反応度はなく、その後再スクリーニングし、全部のプレートを実施したところ、多数のウェルにおいて中程度の反応度があった。Ｔ０６０８０９－２Ｈ３－１Ｂ８－１Ｃ１０－１Ｆ９のウェル１Ｇ３が最も高い反応度を有し、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。残りの反応性ウェルをプールした。１１日後、サブクローニングしたプレートが真菌の混入の証拠を示し、廃棄した。プールした残りの反応性細胞（Ｔ０６０８０９－２Ｈ３－１Ｂ８－１Ｃ１０－１Ｆ９）を増殖させ、７日後に、１０枚の９６ウェルプレートにサブクローニングした。２週間後、これらのサブクローニングプレートをスクリーニングし、Ｔ０６０８０９－２Ｈ３－１Ｂ８－１Ｃ１０－１Ｆ９のウェル２Ｄ８および３Ｆ９が最も高いヌクレオリン反応度を有し、翌日、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。９日後、サブクローニングしたプレートが、再度真菌の混入の証拠を示し、廃棄した。凍結プールしたＴ０６０８０９－２Ｈ３－１Ｂ８－１Ｃ１０細胞を解凍し、増殖させ、１０日後に５枚の９６ウェルプレートにサブクローニングした。２週間後、プレートを、ヌクレオリン反応度に関してスクリーニングし、翌日、Ｔ０６０８０９－２Ｈ３－１Ｂ８－１Ｃ１０のウェル１Ｂ７および１Ｄ６が陽性であることを確認し、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。１０日後、プレートを、ヌクレオリン反応度に関してスクリーニングし、Ｔ０６０８０９－２Ｈ３－１Ｂ８－１Ｃ１０－１Ｄ６のウェル２Ｄ１１および２Ｅ９が最も高い反応度を有し、翌日、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３６９】
第６ラウンドのサブクローニング。１７日後、サブクローニングプレートを、ヌクレオリン反応度に関してスクリーニングし、Ｔ０６０８０９－２Ｈ３－１Ｂ８－１Ｃ１０－１

Ｄ６－２Ｄ１１のウェル２Ｃ７が最も高いヌクレオリン反応度を有し、翌日、限界希釈クローニングによって、１０枚の９６ウェルプレートにサブクローニングした。クローン性コロニーが時間と共にゆっくりと現れ、４から６週間の間にヌクレオリン反応度に関してスクリーニングした。４つのウェル（３Ｄ８、１０Ｃ３、７Ｇ９、１Ｈ４）が反応度を有した。クローンＴ０６０８０９－２Ｈ３－１Ｂ８－１Ｃ１０－１Ｄ６－２Ｄ１１－２Ｃ７－１Ｈ４を、その優れた成長特性のために、機能的抗体試験のために増殖させた。

【０３７０】

クローン９Ｆ９。初期スクリーニングおよび一次サブクローニング。２つの扁桃腺試料を受理し、プールし、１０×９６ウェルプレートからなる単一のレパートリーに処理した（Ｔ０６１５０９）。これらを、１０日後、プレートプールおよびウェルプールに関してスクリーニングした。翌日、ＥＬＩＳＡによる確認を実施し、反応性ウェルＴ０６１５０９－９Ｆ９を特定し、翌日、これを１枚のプレート上の６０のウェルにサブクローニングした。

【０３７１】

二次サブクローニング。サブクローニングプレートを、単一のカラムプールとしてスクリーニングし、反応度は全くなく、その後再スクリーニングした。その後、全プレートを再スクリーニングした。Ｔ０６１５０９－９Ｆ９のウェル１Ｄ１１が最も高い反応度を有し、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３７２】

三次サブクローニング。サブクローニングプレートを、個別のカラムプールとしてスクリーニングし、１つの反応性ウェルがあった。その後、全プレートのスクリーニングを実施し、Ｔ０６１５０９－９Ｆ９－１Ｄ１１のウェル１Ｄ１０が最も高い反応度を有し、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３７３】

四次サブクローニング。サブクローニングプレートを、個別のカラムプールとしてスクリーニングし、反応度はなく、もう一度再スクリーニングしたが、反応度はなかった。その後、全部のプレートのスクリーニングを実施し、中程度の反応度があった。Ｔ０６１５０９－９Ｆ９－１Ｄ１１－１Ｄ１０のウェル１Ｆ９が最も高い反応度を有し、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。残りの反応性ウェルをプールし、増殖させ、－８０℃において凍結した（Ｔ０６１５０９－９Ｆ９－１Ｄ１１－１Ｄ１０）。

【０３７４】

第５ラウンドのサブクローニング。サブクローニングプレートを、個別のカラムプールとしてスクリーニングし、複数の反応性ウェルがあった。全部のプレートのスクリーニングを実施し、中程度の反応度があった。Ｔ０６１５０９－９Ｆ９－１Ｄ１１－１Ｄ１０－１Ｆ９のウェル１Ｂ６が最も高い反応度を有し、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。残りの反応性ウェルをプールした。１１日後、サブクローニングしたプレートが真菌の混入の証拠を示し、廃棄した。プールした残りの反応性細胞（Ｔ０６１５０９－９Ｆ９－１Ｄ１１－１Ｄ１０－１Ｆ９）を増殖させ、７日後に、１０枚の９６ウェルプレートにサブクローニングした。２週間後、これらのサブクローニングプレートをスクリーニングし、Ｔ０６１５０９－９Ｆ９－１Ｄ１１－１Ｄ１０－１Ｆ９のウェル６Ｂ９および９Ｄ３が最も高いヌクレオリン反応度を有し、翌日、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。９日後、サブクローニングしたプレートが再度真菌の混入の証拠を示し、廃棄した。凍結プールしたＴ０６１５０９－９Ｆ９－１Ｄ１１－１Ｄ１０細胞を解凍し、増殖させ、１０日後に５枚の９６ウェルプレートにサブクローニングした。２週間後、プレートを、ヌクレオリン反応度に関してスクリーニングし、翌日、Ｔ０６１５０９－９Ｆ９－１Ｄ１１－１Ｄ１０のウェル２Ｃ７および２Ｆ８が陽性であることを確認し、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。１０日後、プレートを、ヌクレオリン反応度に関してスクリーニングし、Ｔ０６１５０９－９Ｆ９－１Ｄ１１－１Ｄ１０－２Ｆ８のウェル２Ｄ１１

および２Ｂ６が最も高い反応度を有し、翌日、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３７５】

第６ラウンドのサブクローニング。１７日後、サブクローニングプレートを、ヌクレオリン反応度に関してスクリーニングし、Ｔ０６１５０９－９Ｆ９－１Ｄ１１－１Ｄ１０－２Ｆ８－２Ｄ１１のウェル１Ｆ４が最も高いヌクレオリン反応度を有し、翌日、限界希釈クローニングによって、１０枚の９６ウェルプレートにサブクローニングした。クローン性コロニーが時間と共にゆっくりと現れ、４から６週間の間にヌクレオリン反応度に関してスクリーニングした。３つのウェル（４Ｅ８、１Ｃ７、８Ａ６）が反応度を有した。クローンＴ０６１５０９－９Ｆ９－１Ｄ１１－１Ｄ１０－２Ｆ８－２Ｄ１１－１Ｆ４－４Ｅ８を、その優れた成長特性のために、機能的抗体試験のために増殖させた。

【０３７６】

クローン８Ｇ４。初期スクリーニングおよび一次サブクローニング。扁桃腺試料を受理し、１０×９６ウェルプレートからなる不死化レパートリーに処理した（Ｔ０８１００９）。１１日後、ライブラリーを、ヌクレオリンに対する反応度に関してスクリーニングした。ＥＬＩＳＡによる確認を実施し、反応性ウェルを特定し（Ｔ０８１００９－８Ｇ４）、これを、単一プレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３７７】

二次サブクローニング。１９日後サブクローニングプレートをスクリーニングし、ヌクレオリン反応度を有する２つのウェルを特定した（Ｔ０８１００９－８Ｇ４のウェル１Ｃ９および１Ｆ３）。ウェル１Ｆ３が最も高い反応度を有し、３日後、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３７８】

三次サブクローニング。３週間後、サブクローニングプレートをスクリーニングし、複数のウェルがヌクレオリン反応度を有した。Ｔ０８１００９－８Ｇ４－１Ｆ３のウェル２Ｇ４および２Ｈ３が最も高い反応度を有し、翌日、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。残りの反応性ウェルをプールした。５日後、サブクローニングしたプレートが真菌の混入の証拠を示し、廃棄した。プールした残りの反応性細胞（Ｔ０８１００９－８Ｇ４－１Ｆ３）を増殖させ、２週間後、１０枚の９６ウェルプレートにサブクローニングした。１３日後、これらのサブクローニングプレートをスクリーニングし、Ｔ０８１００９－８Ｇ４－１Ｆ３のウェル４Ｇ２および５Ｂ９が最も高いヌクレオリン反応度を有し、２日後、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３７９】

四次サブクローニング。３週間後、サブクローニングプレートをスクリーニングし、Ｔ０８１００９－８Ｇ４－１Ｆ３－４Ｇ２のウェル１Ｅ９および２Ｆ５が最も高いヌクレオリン反応度を有し、翌日、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３８０】

第５ラウンドのサブクローニング。１３日後、サブクローニングプレートをスクリーニングし、Ｔ０８１００９－８Ｇ４－１Ｆ３－４Ｇ２－２Ｆ５のウェル２Ｃ１０および２Ｅ８が最も高いヌクレオリン反応度を有し、翌日、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３８１】

第６ラウンドのサブクローニング。２５日後、サブクローニングプレートをスクリーニングし、Ｔ０８１００９－８Ｇ４－１Ｆ３－４Ｇ２－２Ｆ５－２Ｅ８のウェル２Ｄ１１が最も高いヌクレオリン反応度を有した。４日後、ウェル２Ｄ１１を、限界希釈クローニングによって、１０枚の９６ウェルプレートにサブクローニングした。クローン性コロニーが時間と共にゆっくりと現れ、１７から３３日間の間にヌクレオリン反応度に関してスクリーニングした。複数のウェル（７Ｅ９、４Ｃ９、４Ｄ９、６Ａ３、１０Ｆ８、８Ｂ３）

が反応度を有した。クローンＴ０８１００９－８Ｇ４－１Ｆ３－４Ｇ２－２Ｆ５－２Ｅ８－２Ｄ１１－８Ｂ３を、その優れた成長特性のために、機能的抗体試験のために増殖させた。

【０３８２】

クローンＰ１Ｃ６。初期スクリーニングおよび一次サブクローニング。末梢血試料を受理し、１０×９６ウェルプレートからなる不死化レパートリーに処理した（ＰＢ１２０９０９）。９日後、ライブラリーを、ヌクレオリンに対する反応度に関してスクリーニングした。ＥＬＩＳＡによる確認を実施し、反応性ウェルを特定し（ＰＢ１２０９０９－１Ｃ６）、３日後、これを単一のプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３８３】

二次サブクローニング。３週間後、サブクローニングプレートをスクリーニングし、ヌクレオリン反応度を有する２つのウェルを特定した（ＰＢ１２０９０９－１Ｃ６のウェル１Ｈ２および１Ｈ９）。両方を、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３８４】

三次サブクローニング。１７日後、サブクローニングプレートをスクリーニングし、ＰＢ１２０９０９－１Ｃ６－１Ｈ９のウェル２Ｆ４および２Ｇ３が最も高いヌクレオリン（ｎｕｃｌｉｏｌｉｎ）反応度を有し、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３８５】

四次サブクローニング。３週間後、サブクローニングプレートをスクリーニングし、ＰＢ１２０９０９－１Ｃ６－１Ｈ９－２Ｇ３のウェル２Ｅ７および２Ｃ９が最も高いヌクレオリン反応度を有し、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３８６】

第５ラウンドのサブクローニング。１７日後、サブクローニングプレートをスクリーニングし、ＰＢ１２０９０９－１Ｃ６－１Ｈ９－２Ｇ３－２Ｃ９のウェル１Ｇ６および１Ｈ１０が最も高いヌクレオリン反応度を有し、翌日、それぞれ、単一の９６ウェルプレート上の６０ウェルにサブクローニングした。

【０３８７】

第６ラウンドのサブクローニング。２週間後、サブクローニングプレートをスクリーニングし、ＰＢ１２０９０９－１Ｃ６－１Ｈ９－２Ｇ３－２Ｃ９－１Ｇ６ウェル１Ｆ５が最も高いヌクレオリン反応度を有した。３日後、ウェル１Ｆ５を、限界希釈クローニングによって、１０枚の９６ウェルプレートにサブクローニングした。クローン性コロニーが時間と共にゆっくりと現れ、２２および２８日の間にヌクレオリン反応度に関してスクリーニングした。複数のウェル（３Ｃ７、７Ｄ６、１０Ｆ９、１０Ｇ１０）が反応度を有した。クローンＰＢ１２０９０９－１Ｃ６－１Ｈ９－２Ｇ３－２Ｃ９－１Ｇ６－１Ｆ５－３Ｃ７を、その優れた成長特性のために、機能的抗体試験のために増殖させた。

【０３８８】

（実施例２）

結果

ヌクレオリンおよびＢｃｌ－２タンパク質は、正常なヒトボランティア由来のＢ細胞と比較して、Ｂ－ＣＬＬ細胞の細胞膜および細胞質において過剰発現される。ＣＬＬはその臨床過程の大部分の間緩慢性であり、アポトーシスを避けることによって、緩慢性期の間クローン性Ｂ細胞は骨髄および循環に蓄積する（Ｋｌｅｉｎら、２０００年）。ＣＬＬ細胞は、抗アポトーシスタンパク質Ｂｃｌ－２を過剰発現することによって、アポトーシスを避ける。ｂｃｌ－２のｍＲＮＡおよびタンパク質の高レベル発現は、ｂｃｌ－２の転写を強化することが公知である、遺伝子の再構成の不在下で見られる（Ｂａｋｈｓｈｉ　ら、１９８５年；Ｒｏｂｅｒｔｓｏｎら、１９９６年；Ｓｔｅｕｂｅら、１９９５年）。本発明者らの一人は、ｂｃｌ－２　ｍＲＮＡが、健康なボランティア由来の正常なＣＤ１９

＋Ｂ細胞と比較して、患者由来のＣＬＬ細胞において高度に安定化されることを発見した（Ｏｔａｋｅら、２００７年）。さらに、本発明者らは、ＣＬＬ細胞におけるｂｃｌ－２のｍＲＮＡの安定性の強化が、安定化タンパク質のヌクレオリンと、ｂｃｌ－２　ｍＲＮＡの３’－ＵＴＲにおけるＡＲＥエレメントとの結合の直接の結果であったことを示した。さらに、ヌクレオリンは、検査したすべての患者由来のＣＬＬ細胞の細胞質において過剰発現された（図１）。

【０３８９】

末梢血試料を、未治療のＣＬＬを有する１７例の患者および９例の健康なボランティアから得た。単核細胞を、個々の血液試料から単離し、Ｂ細胞を、ｐａｎ－Ｂ細胞マーカーであるＣＤ１９に関する陽性選択を使用して、免疫磁気分離法によって、この分画から精製した。その後、ヌクレオリンおよびＢｃｌ－２タンパク質のサイトゾルレベルを、患者由来のＣＤ１９＋ＣＬＬ細胞中と、健康なボランティア由来のＣＤ１９＋Ｂ細胞中のレベルにおいて比較した（Ｏｔａｋｅら、２００７年）。ヌクレオリンは、ｂｃｌ－２　ｍＲＮＡの安定化部位であると仮定されるので、ヌクレオリンの細胞質レベルを検査した。ヌクレオリンおよびＢｃｌ－２タンパク質の非核（細胞質）レベルを、Ｓ１０抽出液の免疫ブロットによって決定した。様々な患者に由来する免疫ブロットの結果を正確に比較するために、免疫ブロットにおけるヌクレオリンおよびＢｃｌ－２タンパク質のバンドの統合密度値（ＩＤＶ）を、ヌクレオリンおよびＢｃｌ－２の外部標準の公知の量から得たＩＤＶ値に対して正規化した。この分析により、９例の正常なボランティア由来のＢ細胞と比較して、１７例の患者由来のＣＬＬ細胞において、Ｂｃｌ－２のレベルが１１倍上昇し（ｐ＜０．００１）、およびヌクレオリンのレベルが２６倍上昇した（ｐ＜０．００１）ことが明らかにされた（図１）。さらに、強化されたＢｃｌ－２タンパク質のレベルは、ヌクレオリンレベルの増加と正に相関した（ピアソンの相関＝０．８３、ｐ＜０．００１）。ＣＬＬ細胞および正常なＢ細胞の間の核の分画中のヌクレオリンのレベルに有意差は観察されなかった。以前に治療を受けたことがない、疾患の早期ステージの患者を含むすべてのＣＬＬ患者において、ヌクレオリンが一様に過剰発現したという事実は、ｂｃｌ－２　ｍＲＮＡのヌクレオリン安定化が、疾患の進化の特徴または化学療法の付帯徴候ではなく、ＣＬＬの発症機序における早期事象であることを示唆している。

【０３９０】

ヌクレオリンおよびＢｃｌ－２タンパク質は、正常なヒトボランティア由来のＢ細胞と比較して、Ｂ－ＣＬＬ細胞の細胞膜および細胞質において過剰発現される。患者由来のＣＬＬ細胞および健康なボランティア由来のＢ細胞の共焦点顕微鏡研究を実施し、免疫ブロッティングによって得られた結果を確認した。ヌクレオリンの局在化を、抗ヌクレオリンＭＡｂおよびＦＩＴＣ－抗マウスＩｇＧ二次抗体を使用する間接的免疫蛍光法によって決定した。ＤＮＡを、ヨウ化プロピジウムを用いて染色した。図２Ａの重ね合わせた画像は、ヌクレオリンが、ＣＬＬ細胞の細胞膜、細胞質および核に存在するが、Ｂ細胞の核にだけ存在したことを示す。これらの結果は、免疫ブロットがＣＬＬ細胞の細胞膜および細胞質中のヌクレオリンの局在化を示すが、正常なＢ細胞においては局在化を示さないことと一致した。

【０３９１】

ヌクレオリンは、ＭＣＦ－１０Ａ正常乳房上皮細胞と比較して、ＭＣＦ－７乳癌細胞においても高度に過剰発現した。ＭＣＦ－７およびＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳癌細胞ならびにＭＣＦ－１０Ａ正常乳房上皮細胞中のヌクレオリンの細胞内局在化を、上記の間接的免疫蛍光法によって決定した（Ｓｏｕｎｄａｒａｒａｊａｎら、２００８年）。図２Ｂの重ね合わせた画像は、ヌクレオリンが、ＭＣＦ－７細胞の核、細胞膜および細胞質のいたるところに存在し（緑色蛍光）、一方、正常ＭＣＦ－１０Ａ細胞において、ヌクレオリンは核にのみ検出されたことを示す。これは、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳癌細胞に関してもまた事実であった（Ｓｏｕｎｄａｒａｒａｊａｎら、２００８年）。

【０３９２】

ヌクレオリンおよびＢｃｌ－２タンパク質は、ＭＣＦ－１０Ａ正常乳房上皮細胞と比較

して、ＭＣＦ－７およびＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳癌細胞の細胞膜および細胞質においても過剰発現される。ヌクレオリンの細胞内局在化を、ヌクレオリンに対する一次抗体およびＦＩＴＣ－コンジュゲート抗マウスＩｇＧ二次抗体（緑色蛍光）を使用する間接的免疫蛍光法によって決定した。ＤＮＡを、ヨウ化プロピジウムを用いて染色した（赤色蛍光）。図３の重ね合わせた画像は、ヌクレオリンが、ＭＣＦ－７細胞の核（黄色蛍光）、細胞膜および細胞質（緑色蛍光）のいたるところに存在し、一方、正常ＭＣＦ－１０Ａ細胞において、ヌクレオリンは核にのみ検出されたことを示す。ＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳癌細胞中のヌクレオリンの細胞内局在化は、ＭＣＦ－７細胞と同様であった（Ｓｏｕｎｄａｒａｒａｊａｎら、２００８年）。

【０３９３】

ＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスに生着した、患者由来のＡＭＬ芽球細胞は、強烈なヌクレオリン染色を示す。ヌクレオリンが腫瘍特異的抗原であり、さらにヒトＡＭＬの発症機序において役割を果たすことのさらなる証拠は、ヒトＡＭＬ異種移植研究によりもたらされる。骨髄由来の生検標本を、芽球細胞質および／または核におけるヌクレオリン発現に関して評価した。免疫組織化学的分析を、アーカイブに保管された骨髄生検のパラフィン包埋組織切片のスライドグラスについて実施した。すべての症例において、ＡＭＬの芽球を、周囲の正常な骨髄エレメントと比較した。本発明者らは、抗ヌクレオリン染色（フクシン染色）がＡＭＬ芽球細胞において強烈であり、一方、骨髄の正常なエレメントは（暗青色対比染色）、弱陽性または完全な陰性のどちらかであったことを観察した（図４）。ヌクレオリンの強い発現は、これまでに試験したすべてのＡＭＬ試料において観察されている。

【０３９４】

１０匹の雌のＮＯＤ－ＳＣＩＤマウス（１１週齢）に、それぞれ、２５μｇの抗アシアロＧＭ抗体をｉ．ｐ．注射し、Ｃｓ１３７照射器において２．３Ｇｙに曝露した。同じ日に、１０匹のマウスのうちの５匹に、ＡＭＬと診断されたヒト被験体由来の$2\times10^{7}$のＰＢＭＣを、それぞれｉ．ｐ．注射した。この被験体において、ＰＢＭＣの少なくとも６０％がＡＭＬ芽球であった。ＰＢＭＣのｉ．ｐ．注射の４ヵ月後、すべてのマウスを安楽死させた。ＡＭＬ細胞をｉ．ｐ．注射した５匹のうちの２匹において、脾臓が肥大し、脾臓表面およびその内部に結節性の病変が示された。各マウスの脾臓の一部を処理し、脾細胞を分離し、ヒトＣＤ４５＋細胞の存在に関してフローサイトメトリーによって分析した。異常な脾臓を有するマウスにおいて、脾細胞の一部を、抗ヒトＣＤ４５抗体を用いて染色し、これらのマウスにヒトＡＭＬ細胞が生着したことを実証した。本発明者らは、次に、組織病理学的分析および免疫組織化学的分析を、生着したＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスおよび対照のＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスの脾臓について実施した（図５Ａ）。脾臓における白血病生着の結節性範囲は、ヌクレオリンの発現に関して著しく陽性であった。

【０３９５】

ヌクレオリンは、正常な乳房組織と比較して、ヒト乳癌においても過剰発現される。さらに、５０例の患者由来の腫瘍および隣接正常乳房組織を含むヒト乳癌組織アレイに関して実施されたヌクレオリン免疫組織化学により、ヌクレオリンが、正常隣接組織と比較して、腫瘍において過剰発現されたことが示された。代表的な結果は、乳癌の最も一般的な形態を表す（図５Ｂ）。ヌクレオリンは、浸潤性腺管癌（８／８被検症例）および髄様癌（６／６症例）において高度に発現され、粘液腺癌（８／８症例）において中程度に発現されたが、隣接正常組織においては検出されなかった（図５Ｂ）。

【０３９６】

上記の図１～５Ｂに提示された結果は、ヌクレオリンが、腫瘍特異的抗原として特定のヒト腫瘍細胞の細胞表面において過剰発現されることの強い証拠を提供する。ヒトＣＬＬ（および場合によりＡＭＬおよび乳癌）に関して、ヌクレオリンの過剰発現はこの疾患の発症機序における早期事象である。「化学的」抗ヌクレオリン抗体と考えられるヌクレオリン標的化アプタマーＡＳ１４１１（Ｓｏｕｎｄａｒａｒａｊａｎら、２００８年；Ｓｏｕｎｄａｒａｒａｊａｎら、２００９年）は、難治性ＡＭＬおよび再発ＡＭＬに関して、第ＩＩ相臨床試験（Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ　Ｉｄｅｎｔｉｆｉｅｒ

ＮＣＴ００５１２０８３）において期待できる活性を示した。したがって、総合するとこれらの結果は、ヌクレオリンが、治療用抗体の開発に関する極めて良い標的であることを示す。

【０３９７】

Ｂｃｌ－２　ｍＲＮＡの安定性は、正常なＢｃ細胞と比較して、ＣＬＬ細胞において増加する。正常Ｂ細胞と比較したＣＬＬ細胞におけるＢｃｌ－２の過剰発現は、ｂｃｌ－２　ｍＲＮＡの転写の強化、ｂｃｌ－２　ｍＲＮＡの安定性の増加またはｂｃｌ－２　ｍＲＮＡの翻訳効率の増加のいずれかによりもたらされると思われる。ｂｃｌ－２　ｍＲＮＡはＣＬＬ細胞において非常に安定であり、アクチノマイシンＤと一緒に長時間インキュベーションする必要があり、このことは細胞にとって毒性であるので、原発性ＣＬＬ細胞におけるｍＲＮＡの安定性を、アクチノマイシンＤを使用して転写を遮断する標準的な方法により測定することは困難である。この問題を避けるために、本発明者らは、ＣＬＬ細胞および健康なボランティア由来の正常Ｂ細胞中の発生期の、スプライシングされていない異種核ｂｃｌ－２　ｍＲＮＡ（ｈｎＲＮＡ）および成熟ｂｃｌ－２　ｍＲＮＡのレベルを測定した。この方法は、様々な細胞中のｍＲＮＡ転写およびｍＲＮＡの崩壊の相対的速度を決定するために使用され、成功してきた。各試料からの合計ＲＮＡの等量を、逆転写し、２セットのプライマーを用いてリアルタイムＰＣＲを実施した。一反応は、（ｈｎＲＮＡを選択的に増幅するために）第１のイントロンとアニーリングするプライマーを含有し、一反応は、（スプライシングされた成熟ＲＮＡを選択的に増幅するため）２つの隣接エクソン中の配列とアニーリングするプライマーを用いた。本発明者らは、ｂｃｌ－２　ｍＲＮＡ対ｂｃｌ－２　ｈｎＲＮＡの比率が、正常Ｂ細胞と比較してＣＬＬ細胞において約３倍高いことを見出した（ｐ＜０．００１）（図６）。ＣＬＬ細胞に関するｂｃｌ－２　ｍＲＮＡ／ｂｃｌ－２　ｈｎＲＮＡの３倍高い比率は、完全に、正常Ｂ細胞中のｂｃｌ－２　ｍＲＮＡレベル（β－アクチンｍＲＮＡに対して１．１±０．２ＳＥＭ）と比較して、ＣＬＬ細胞中のｂｃｌ－２　ｍＲＮＡのレベルの増加（β－アクチンｍＲＮＡに対して３．３±０．４ＳＥＭ）による。ＣＬＬ細胞（β－アクチンｍＲＮＡに対して６．５±１．４ＳＥＭ）対正常Ｂ細胞（β－アクチンｍＲＮＡに対して５．５±１．４ＳＥＭ）中のｂｃｌ－２　ｈｎＲＮＡのレベルに有意差は観察されなかった。これらの結果は、ｂｃｌ－２　ｍＲＮＡが、正常Ｂ細胞と比較してＣＬＬ細胞において相対的により安定であることを示す。さらに、それが事実であったならば、ｂｃｌ－２　ｍＲＮＡ／ｈｎＲＮＡ比率が正常Ｂ細胞に対してＣＬＬにおいてより低くなったはずなので、ｂｃｌ－２　ｍＲＮＡの転写速度は、ＣＬＬ細胞において相対的に高くなかった。

【０３９８】

ヌクレオリンの過剰発現がｂｃｌ－２　ｍＲＮＡを上方制御する機序。ヌクレオリンによるｂｃｌ－２　ｍＲＮＡ安定化の機序を、ｉｎ　ｖｉｔｒｏのＲＮＡ崩壊系を使用する、精製されたＣＬＬ細胞および正常Ｂ細胞から調製した抽出液中の、ｂｃｌ－２　ＲＮＡ転写産物の崩壊速度に従って検査した（Ｓｅｎｇｕｐｔａ　ら、２００４年）。キャップをし、ポリアデニル化したｍＲＮＡをこれらのアッセイに使用し、ポリ（Ａ）－特異的リボヌクレアーゼ（ＰＡＲＮ）による、キャップ刺激性脱アデニル化、その後のエキソソームによるｍＲＮＡボディーの急速な崩壊を伴う、ｉｎ　ｖｉｖｏの崩壊を模倣した（Ｃｈｅｎら、２００１年；Ｍｕｋｈｅｒｊｅｅら、２００２年）。$^{32}$Ｐ－標識ｂｃｌ－２－ＡＲＥ転写産物を、ＣＬＬおよび正常Ｂ細胞由来の細胞質Ｓ１００抽出液と一緒に、ポリ（Ａ）の存在下でインキュベートし、脱アデニル化を活性化した。図７に示すように、ｂｃｌ－２転写産物は、ＣＬＬ細胞の抽出液中より正常Ｂ細胞の抽出液中でより急速に崩壊した。４例の患者由来のＣＬＬ細胞の細胞質抽出液におけるｂｃｌ－２　ＲＮＡの平均半減期は、データの外挿により７２分であることが推定され、一方、正常Ｂ細胞抽出液における転写産物の平均半減期は１２分であった（図７）。ＡＲＥを欠くｂｃｌ－２　ｍＲＮＡコーディング領域転写産物（ｂｃｌ－２－ＣＲ　ＲＮＡ）の崩壊速度は、正常Ｂ細胞およびＣＬＬ細胞の抽出液において同様であったので、正常Ｂ細胞抽出液におけるｂｃｌ－２－ＣＲ（コーディング領域）－ＡＲＥ　ＲＮＡ転写産物の急速な崩壊は、高度にＡＲＥ

依存性であった。２８０ｎＭの精製組換えヌクレオリン［Δ１－２８３　Ｎｕｃ－（Ｈｉｓ）６］を正常Ｂ細胞の抽出液に添加することにより、ｂｃｌ－２－ＡＲＥの崩壊速度が非常に遅くなった（外挿による半減期が６２分）ことに留意することも重要である。総合すると、これらの結果は、ヌクレオリンが、ｂｃｌ－２　ｍＲＮＡの３’－ＵＴＲにおいてＡＲＥと結合し、ｍＲＮＡを分解から保護することによって、ｂｃｌ－２　ｍＲＮＡを安定化することが示される。

【０３９９】

ヌクレオリン特異的ヒト抗体の開発。累積的に、上記の予備研究は、ヌクレオリンが、抗体に基づくＣＬＬおよびＡＭＬならびにおそらく乳癌の特定の形態の免疫療法に対する有望な腫瘍抗原標的であることを示す。したがって、本発明者らは、ヒト扁桃腺から作製された不死化Ｂ細胞ライブラリーからヒトＭＡｂを作り出す、新規なｉｎ　ｖｉｔｒｏの方法を使用する、ヌクレオリンに特異的な治療用ヒトＭＡｂの創生を計画した。本技術は、１）全ステップがｉｎ　ｖｉｔｒｏである迅速な抗体作製、２）ヒトの免疫化が必要ない、３）得られた抗体が、完全ヒト抗体であり、したがって、拒絶されず、血清の疾病を引き起こさないことを含むいくつかの有利性を保有する。この技術は、国立がん研究所の支援を受けて発明され、連邦政府は本発明に関して特定の権利を有する。国際特許出願は、（ＰＣＴ／ＵＳ２００８／０７２１２４）は、２００８年、８月に出願された。この技術の概説を図８に表した。ヒトＢ細胞を健康な小児由来の扁桃腺摘出標本から単離し、その後、エプスタイン・バー・ウイルス（ＥＢＶ）に有効に換算させ、大規模なＢ細胞形質転換をもたらした。感染したＢ細胞を、Ｂ細胞受容体のシグナル伝達およびＴ細胞のヘルプを模倣する薬剤を用いて分化を誘導した。扁桃腺はＢ細胞の豊富な供給源であるので、この過程により、通常$10^7$～$10^8$のＢ細胞を単離でき、それぞれが固有の抗体特異性を有する。有効な感染過程を図９Ａに明示し、緑色蛍光タンパク質マーカー遺伝子を含有する組換えＥＢＶ（ＥＢｆａＶ－ＧＦＰ）の１０×濃縮ウイルスストックを用いた扁桃腺Ｂ細胞のスピンフェクション後（Ｓｐｅｃｋら、１９９９年ａ；Ｓｐｅｃｋら、１９９９年ｂ）、２４時間後、扁桃腺Ｂ細胞のほぼ１００％が感染したことを示す。その後、感染細胞を、９６ウェルプレートに、組換えＣＤ４０Ｌ、Ｂａｆｆおよび抗ヒトＩｇＭ（Ｆａｂ’）$_2$からなる所有者の分化カクテル（Ｄｉｆｆ－Ｃｋｔｌ）の存在下で、$10^3$～$10^4$細胞／ウェルでプレーティングし、免疫グロブリン（Ｉｇ）アイソタイプクラスを、２週間にわたってＩｇＭからＩｇＧに切り替えることを誘導した。図９Ｂに見られるように、ＩｇＧが、通常１～４μｇ／ｍｌの範囲のレベルで培養上清内に分泌される。この過程は、個別の扁桃腺から単離されたＢ細胞の数に依存して、推定$10^6$～$10^7$の抗体特異性を有するポリクローナルＩｇＧを分泌する、ＥＢＶ不死化扁桃腺Ｂ細胞ライブラリーを、再生可能に生み出す。その後、ライブラリー由来の細胞培養上清を、対象の様々な抗原に対する特異結合に関してスクリーニングできる。その後、所望の特異性を有するＩｇＧを産生するＢ細胞を、制限希釈クローニングによって単離することができ、ＩｇＧを培養上清から精製した。大規模な生産のために、組換えＩｇＧは、クローン性Ｂ細胞のＩｇ遺伝子を、哺乳動物発現ベクターにサブクローニングし、生物学的生産に一般的に使用される細胞系をトランスダクションすることによって生産できる。今日までに、本発明者らは、４０を超えるライブラリーを作製しており（データ非掲載）、これらを、様々な抗原標的に対する反応度に関してスクリーニングした。

【０４００】

このプラットホーム技術は、治療との関連を有する自己抗体、例えばヌクレオリンのような腫瘍抗原に対する抗体を生産するために理想的である。自己反応性Ｂ細胞は、それらの生存および分化に必要とされる十分なＴ細胞のヘルプを、ＩｇＧ分泌形質細胞に受け取ることは通常ないので、普通、健康な小児は、ヌクレオリンなどの自己タンパク質に対して強力な二次抗体反応を起こすことは期待されない。その代わりに、自己反応性Ｂ細胞は、ｉｎ　ｖｉｖｏで耐性化するか、または欠失される。しかし、これらのデータは、扁桃腺または末梢血に由来する希少なヌクレオリン反応性Ｂ細胞を、自己反応性Ｂ細胞を不死化するためにＥＢＶを使用し、Ｉｇアイソタイプクラスの切替えおよびヌクレオリン特異

的ＩｇＧのｉｎ　ｖｉｔｒｏの分泌を人為的にそれらにもたらすために分化カクテルを使用して救うことができることを示す。この取組みを使用して、本発明者らは、１２種の不死化扁桃腺ライブラリーを、酵素結合免疫測定吸着法（ｅｎｚｙｍｅ　ｌｉｎｋｅｄ　ｉｍｍｕｎｏｓｏｒｂｅｎｔ　ａｓｓａｙ）（ＥＬＩＳＡ）によって、ヌクレオリン特異的ＩｇＧに関してスクリーニングした。図１０に見られるように、細菌中で産生された組換えヒトヌクレオリン（Δ１－２８３Ｎｕｃ－（Ｈｉｓ）$_6$）に強く反応するＩｇＧ抗体を産生する、６種のヒトＢ細胞系が単離された。陽性対照として、結合を、マウス抗ヌクレオリンＭＡｂ　ＭＳ３（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）から得られた結合と比較し、ヒトＢ細胞系由来培養上清は同じ様式で上昇したが、陰性対照として機能するＨ５ヘマグルチニン（ヒト抗ＨＡ）に特異的なＩｇＧ１抗体を産生した。

【０４０１】

ヒト抗ヌクレオリン抗体の予備特徴付け。これらの抗ヌクレオリン抗体のいくらかまたはすべてが、治療用能力を有し得るかどうかを試験するために、本発明者らは、ＭＶ４－１１細胞のさらなるＥＬＩＳＡ分析、ウェスタンブロッティング、フローサイトメトリー、免疫組織化学および細胞毒性による死によって抗体の特徴付けを開始した。抗体のうちの４種を、それらが、ＭＶ４－１１ヒト白血病細胞から精製された内因性ヌクレオリンおよび細菌において産生された組換えＨｉｓ－タグ付けヌクレオリン（Δ１－２８３　Ｎｕｃ－（Ｈｉｓ）６を認識するかどうかを試験するために、まずＥＬＩＳＡによってさらにスクリーニングした（Ｉｓｈｉｍａｒｕら、２００９年）。図１１、上のパネルに見られるように、４種のＢ細胞系のうちの３種（５Ｄ１、７Ｇ７および２Ｄ３）に由来する上清は、マウス抗ヌクレオリンＭＳ３と同様（またはより高い）の強度で内因性ヌクレオリンと反応するが、一方、ｈｉｓタグ付け組換えとは様々な程度ですべて結合した。さらに、４種の培養上清のうちの３種（５Ｄ１、３Ｈ１１および２Ｄ３）は、ウェスタンブロッティングにより、ｈｉｓタグ付け組換えヌクレオリンと反応した（図１１、下）。したがって、抗体は、内因性タンパク質およびｈｉｓタグ付けタンパク質との結合の異なるパターンを有し、ウェスタンブロッティング分析において様々に反応し、それぞれが異なるタンパク質エピトープを認識することを示し得る。

【０４０２】

ＣＤＣＣまたはＡＤＣＣの不在下における、ＭＶ４－１１ＡＭＬ細胞およびＭＣＦ－７乳癌細胞に対する抗ヌクレオリンの細胞毒性。図１２は、すべての抗－ＮＵＣ　ＨｕＭＡｂが、ＭＶ４－１１　ＡＭＬ細胞の細胞表面ヌクレオリンと結合するが、それらは、細胞表面にヌクレオリンを発現しない正常扁桃腺細胞とは結合しないことを、さらに明示する。対照的に、リツキシマブは正常扁桃腺細胞と結合したが、ＭＶ４－１１細胞とは結合しかった。さらに、抗ＮＵＣ　ＨｕＭＡｂは、ＭＶ４－１１細胞に対して細胞毒性であった（図１４Ｃ）。ＭＶ４－１１細胞と、各抗体（２μｇ／ｍｌ）と一緒のインキュベーション後、ミトコンドリアの機能を、４８、７２および９６時間後に、ＭＴＳアッセイによって測定した。図１４Ｃは、９６時間で、細胞の生存能力は各抗体に応答して、未処理細胞の約３０～８０％の範囲で減少したことを実証した。比較すると、ヌクレオリン標的化アプタマーＡＳ１４１１（２０μＭ）を一緒にインキュベーション後、細胞の生存能力は、未処理細胞の約４０～６０％に減少し、対照ヒトＩｇＧと一緒のインキュベーションによっては変化がなかった。このアッセイを、補体の不在下、およびＡＤＣＣに必要なエフェクター細胞なしで実施し、抗ヌクレオリンＨｕＭＡｂが、ＣＤＣＣおよびＡＤＣＣとは独立して作用することを示した。これらの発見の要約を表４に提示する。総合すると、これらのデータは、単離した６種の抗体はそれぞれ、異なる結合特性を有し、ヒトヌクレオリンの様々なエピトープのいずれかと結合する、および／またはタンパク質に対して異なる親和性を有することの強力な証拠を提供する。

【０４０３】

結合分析は根本的意義を有するので、治療的立場から最も重要な基準は、抗体が細胞毒性を仲介することである。この理由のため、本発明者らは、ヨウ化プロピジウム（ＰＩ）およびアネキシンＶ染色によってアポトーシスおよび／または細胞死の誘導を測定する、

単純なフローサイトメトリーに基づくアッセイを設定した。アネキシンＶは、ホスファチジルセリン残基と結合し、アポトーシスの誘導の間の早期事象として細胞膜に曝露される。アポトーシスの後期ステージにおいて、またはネクローシスによる細胞死の間、膜の完全性の崩壊が、細胞を失活染料ＰＩに対して透過性にし、フローサイトメトリーを介して検出できる。ＭＶ４－１１細胞を、各抗体および補体の供給源として使用され、補体依存性細胞毒性（ＣＤＣＣ）の検出に必要とされるヒト血清の存在下で１６時間培養し、その後、それらをＰＩおよびアネキシンＶ－ＦＩＴＣを用いて染色した。図１３に見られるように、ヒト抗ＨＡ抗体を用いて処理したＭＶ４－１１細胞（陰性対照）は、未処理細胞と比較して、アネキシンＶまたはＰＩの染色のいずれにおいても有意差を示さなかった。対照的に、それぞれの抗ヌクレオリン抗体は未処理細胞または抗ＨＡ処理細胞と比較して、アネキシンＶ染色の平均蛍光強度において約３倍のシフトを誘導した。同様のシフトは、アポトーシスの化学的誘導因子であるスタウロスポリン（２５μＭ）を用いて処理した細胞においても見られた。抗ヌクレオリン抗体の５Ｄ１および７Ｇ７は、最も強い細胞毒性抗体であり、対照の抗ＨＡ処理に関するわずか１６％と比較して、３８～４０％の細胞が、１６時間後ＰＩおよび／またはアネキシンＶに対して陽性に染色されたが、一方、他の抗ヌクレオリン抗体は細胞の約３０％において細胞毒性を誘導した。ＭＶ４－１１白血病細胞に対する各抗体の相対的細胞毒性活性を、表４に要約する。これらの予備データは、より包括的な細胞毒性試験が、特に抗体５Ｄ１および７Ｇ７に関して是認されることを示す。

【０４０４】

同様の実験を、ＭＣＦ－７乳癌細胞を用いて実施し、ＭＶ４－１１細胞に対するよりも、抗ヌクレオリンＨｕＭＡｂに対してより感受性であることが見出された。補体の不在下において、９６時間後、抗ヌクレオリンＨｕＭａｂは細胞の生存能力を、未処理細胞の２０％未満に阻害したが、一方、ＡＳ１４１１は細胞の生存能力を未処理細胞の８０％に低下させただけであり、対照ヒトＩｇＧは効果を有さなかった（図１４Ａ、左のパネル）。補体依存性細胞毒性を、補体の供給源としてヒトＡＢ血清（２５％　ｖｏｌ／ｖｏｌ）を添加し、平行実験においてアッセイした。図１４Ａ、右のパネルに見られるように、補体の添加は、抗体の細胞毒性作用を強化し、早ければ４８時間で細胞の生存能力を有意に阻害し、９６時間で完全に阻害した。図１４Ｂは、ＨｕＭＡｂは、細胞表面ヌクレオリンを発現しないＭＣＦ－１０Ａ正常乳房上皮細胞の細胞生存能力に関して作用を有さなかったので、細胞毒性作用はＭＣＦ－７細胞に関して選択的であったことを示す。したがって、抗ヌクレオリンＨｕＭＡｂの本発明者らのパネルは、ヒトＡＭＬおよび乳癌細胞系において発現された細胞表面ヌクレオリンに対して特異的に結合し、ＡＤＣＣおよびＣＤＣＣの免疫機序とは独立した実質的な腫瘍細胞の細胞毒性を誘導でき、血清の補体によって強化され得る。

【０４０５】

【表４】

表4 - ヒト抗ヌクレオリン抗体の特徴付けに関して実施された結果の要約

| ヒト抗 Nuc | ELISA 組換え[a] /内因性[b] | | ウェスタンブロッティング | FACS | 細胞毒性 MV4-11[c] / MCF-7[d] | | 重鎖 | 軽鎖 | IHC |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2D3 | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++++ | IgG1 | ラムダ | n.d. |
| 2H3 | +++ | n.d. | n.d. | + | ++ | +++ | IgG1 | カッパ | n.d. |
| 3H11 | ++++ | - | ++ | ++ | ++ | ++++ | IgG1 | ラムダ | n.d. |
| 5D1 | +++ | + | ++ | ++++ | +++ | ++++ | IgG1 | カッパ | + |
| 7G7 | +++ | +++ | - | ++ | +++ | +++ | IgG1 | カッパ | n.d. |
| 9F9 | ++++ | n.d. | n.d. | ++ | ++ | ++++ | IgG1 | カッパ | + |
| 8G4 | +++ | n.d. | n.d. | +++ | +++ | ++++ | IgG1 | ラムダ | n.d. |
| P1C6 | +++ | n.d. | n.d. | +++ | +++ | ++++ | IgG1 | カッパ | n.d. |

[a]組換え 1-283Nuc-$(His)_6$ヌクレオリンに対する結合; [b]MV4-11 白血病細胞から精製されたヌクレオリンに対する結合; [c]96 時間に MTS アッセイによって測定された MV4-11 細胞に対する細胞毒性; [d]96 時間に MTS アッセイによって測定された MCF-7 細胞に対する細胞毒性; n.d.:実施せず

本明細書に開示し、特許請求したすべての組成物および／または方法は、本開示を考慮して、過度の実験をすることなく、作製および実行できる。本発明の組成物および方法を、好ましい実施形態に関して記載しているが、変形が、本発明の構想、精神および範囲を逸脱することなく、本明細書に記載の組成物および／または方法ならびにステップまたは方法ステップの順序に適用できることは当業者には理解されるであろう。より具体的には、化学的および生理的両方で関連する特定の薬剤を、本明細書に記載の薬剤と置き換え、同じまたは同様の結果を得ることができることは理解されるであろう。当業者に明らかなこのような同様の置換および改良すべては、添付の特許請求の範囲に定義されるように、本発明の精神、範囲および構想内である考えられる。

【０４０６】

ＶＩＩＩ．参考文献

以下の参考文献および本出願を通して引用された任意の他の文献は、それらが提供する模範的手順または本明細書中に示される他の補足的な詳説の範囲で、参照により具体的に本明細書に組み込まれる。

【０４０７】

【化１】

U.S. Patent 3,817,837
U.S. Patent 3,850,752
U.S. Patent 3,939,350
U.S. Patent 3,996,345
U.S. Patent 4,179,337
U.S. Patent 4,275,149
U.S. Patent 4,277,437
U.S. Patent 4,301,144
U.S. Patent 4,366,241
U.S. Patent 4,472,509
U.S. Patent 4,485,045
U.S. Patent 4,496,689
U.S. Patent 4,544,545.
U.S. Patent 4,640,835
U.S. Patent 4,657,760
U.S. Patent 4,670,417
U.S. Patent 4,791,192
U.S. Patent 4,816,567
U.S. Patent 4,938,948
U.S. Patent 4,975,278
U.S. Patent 5,013,556
U.S. Patent 5,021,236
U.S. Patent 5,047,335
U.S. Patent 5,196,066
U.S. Patent 5,206,344
U.S. Patent 5,225,212
U.S. Patent 5,278,299
U.S. Patent 5,510,261
U.S. Patent 5,534,615

【０４０８】

【化２】

U.S. Patent Appln. 12/671,936

U.S. Patent Publn. 2009/0191244

U.S. Patent Publn. 2007/0066554

U.S. Patent Publn. 2007/0066554

Atherton *et al.*, *Biol. Reprod.*, 32(1):155-171, 1985.

Bakhshi *et al.*, *Cell*, 41(3):899-906, 1985.

Bates *et al.*, *Exp. Mol. Path.*, 86:151, 2009.

Bose *et al.*, *J. Virol.*, 78:8146, 2004.

Boyd *et al.*, *Mol. Immunol.*, 32:1311-1318, 1996.

Chen *et al.*, Cell, 107(4):451-64, 2001.

Chen *et al.*, *Genes Dev.*, 14(10):1236-48, 2000.

Chen *et al.*, *Mol. Ther.*, 16(2):333-42, 2008.

Christian *et al.*, *J. Cell Biol.*, 163:871-878, 2003.

Cunningham and Wells, *Science,* 244:1081-1085, 1989.

Destouches *et al.*, *PLoS ONE*, 3(6):e2518, 2008.

Dholakia *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264(34):20638-20642, 1989.

Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688, 1985.

Evan *et al.*, *Molec. Cell. Biol.* 5:3610-3616, 1985.

Farin *et al.*, *PLoS ONE*, 4(7): 6128, 2009.

Field *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165, 1988.

Fogal *et al.*, *Angiogenesis*, 12(1):91-100, 2009.

Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.*, 81(19):1484, 1989.

Gattoni-Celli *et al.*, *Am. J. Hematol.*, 84(8):535-8, 2009.

Geahlen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 804:169-175. 1984.

Ginisty *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276(17):14338-43, 2001.

Hopp *et al.*, *BioTechnology*, 6:1204-1210, 1988.

Hovancssian *et al.*, *Cell Research*, 16:174-181, 2006.

Hovanessian *et al.*, *Exp. Cell Res.*, 261(2):312-28, 2000.

Hse *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:9062-9070, 1997.

Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030, 1980.

Ishimaru *et al.*, *Mol. Cancer Res.*, 7(8):1354-66, 2009.

Izumi *et al.*, *Viral Research*, 76(1):17-29, 2001.

Jefferis and Lund, *Chem. Immunol.*, 65:111-128, 1997.

Jefferis and Lund, *Current Opin. Biotech.*, 7:409-416, 1996.

【０４０９】

【化３】

Khatoon *et al.*, *Ann. Neurol*, 26(2):210-215, 1989.

Kibbey *et al., J. Neurosci. Res.*, 42(3):314-22, 1995.

Kim and Baldwin, *Ann. Rev. Biochem.*, 51:459-89, 1982.

King *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264(17):10210-10218, 1989.

Klein *et al., Leukemia*, 14(1):40-6, 2000.

Lapeyre *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(6):1472-6, 1987.

Lutz-Freyermuth *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 87:6393-6397, 1990.

Malhotra *et al., Nature Med.*, 1:237-243, 1995.

Martin et *al., J. Biol. Chem.*, 257:286-288, 1982.

Martin *et al., Science,* 255:192-194, 1992.

Massey, *Nature,* 328:457-458, 1987.

Miller and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 70:190-194, 1973.

Mukherjee *et al., Embo. J.*, 21(1-2):165-74, 2002.

Neuberger *et al., Nature,* 312:604-608, 1984.

O'Shannessy *et al., Anal. Biochem.*, 163(1):204-9, 1987.

Otake *et al., Blood*, 109(7):3069-75, 2007.

Owens and Haley, *Biochem. Biophys. Re.s Commun.*, 142(3):964-971, 1987.

Paborsky *et al., Protein Engineering,* 3(6):547-553, 1990.

PCT Appln. PCT/US2008/072124

PCT Appln. WO 81/01145

PCT Appln. WO 88/07378

PCT Appln. WO 93/23572

PCT Appln. WO 94/11026

PCT Appln. WO 96/32478

Pfeifle and Anderer, *Biochim. Biophys. Acta*, 762(1):86-93, 1983.

Potter and Haley, *Methods Enzymol*, 91:613-633, 1983.

Remington's Pharmaceutical Sci., Maack Publishing Co, Easton Pa, 1990.

Robertson *et al., Leukemia*, 10(3):456-9, 1996.

Said *et al., J. Biol. Chem.*, 277(40):37492-502, 2002.

Sengupta *et al., J. Biol. Chem.*, 279(12):10855-63, 2004.

Serin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272(20):13109-16, 1997.

Sinclair and O'Brien, *J. Biol. Chem.*, 277(4):2876-85, 2002.

Skinner *et al., J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166, 1991.

Soundararajan *et al., Cancer Res.*, 68(7):2358-65, 2008.

【０４１０】

【化４】

Soundararajan *et al., Mol. Pharmacol.*, 76(5):984-91, 2009.

Speck *et al., Arch. Virol.*, 144(6):1123-37, 1999b.

Speck *et al., J. Gen. Virol.*, 80 ( Pt 8):2193-2203, 1999a.

Srivastava and Pollard, *Faseb J.*, 13(14):1911-22, 1999.

Srivastava *et al.*, *FEBS Lett.*, 250(1):99-105, 1989.

Steube *et al., Leukemia*, 9(11):1841-6, 1995.

Takekoshi *et al., J. Biochem.*, 130:299-303, 2001.

Umana *et al. Mature Biotech.*, 17:176-180, 1999.

Vitetta *et al., Science*, 238:1098, 1987.

Weltschof *et al., J. Immunol. Methods*, 179:203-214, 1995.

Westmark and Malter, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 90(2):193-201, 2001.

Wittwe and Howard, *Biochem.*, 29:4175-4180, 1990.

Wright and Morrison, *Trends Biotechnol.*, 15:26-32, 1997).

Yang *et al., Nucl Acids Res.*, 30:2251-2260, 2002.

【図１】

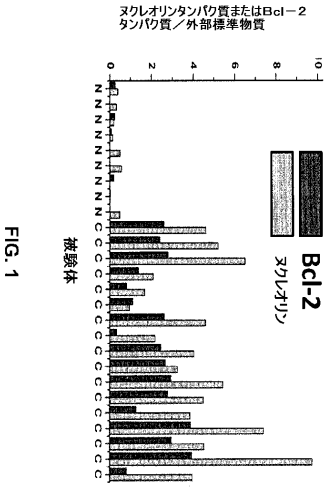


FIG. 1

【図４】

FIG. 4

【図５Ｂ】

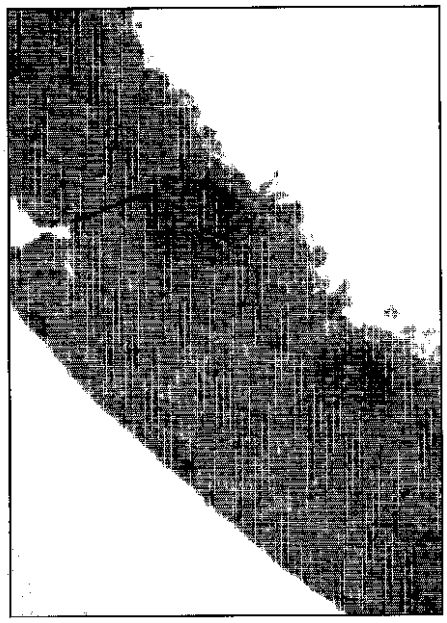

FIG. 5B

【図６】

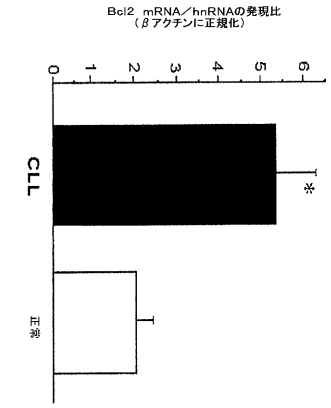


FIG. 6

【図１０】

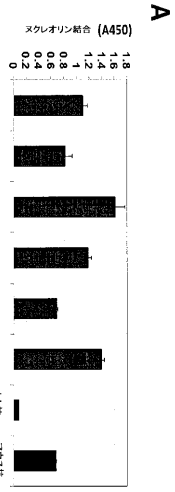


FIG. 10

B

| 抗体 | ウェル | A450 |
|---|---|---|
| 3H11 | 1F8 | 0.629 |
| 3H11 | 3A3 | 0.583 |
| 3H11 | 4H12 | 0.289 |
| 5D1 | 2C10 | 0.575 |
| 5D1 | 4G2 | 0.336 |
| 5D1 | 4H12 | 0.569 |
| 8G4 | 1A11 | 0.833 |
| 8G4 | 2G2 | 0.308 |
| 8G4 | 4B6 | 0.698 |
| P1C6 | 1C7 | 0.636 |
| P1C6 | 2B9 | 0.685 |
| P1C6 | 4H7 | 0.660 |
| 7G7 | 1G9 | 0.576 |
| 7G7 | 3C2 | 0.711 |
| 7G7 | 4A7 | 0.497 |
| 7G7 | 4G9 | 0.368 |
| 7G7 | 5B1 | 0.626 |
| 9F9 | 1A7 | 0.707 |
| 9F9 | 3D4 | 0.624 |
| 9F9 | 5A8 | 0.702 |
| 9F9 | 5D2 | 0.662 |
| 2D3 | 2B1 | 0.642 |
| 2D3 | 3 E4 | 0.674 |
| 2H3 | 1C5 | 0.387 |
| 2H3 | 1H5 | 0.363 |
| 2H3 | 2H8 | 0.563 |
| 2H3 | 3F3 | 0.387 |
| 2H3 | 4C6 | 0.682 |
| 2H3 | 4C12 | 0.701 |
| 2H3 | 4 E3 | 0.399 |
| 2H3 | 5D3 | 0.793 |
| 陰性対照 マウス抗 | -NCL M53 | 0.090 |
| | | 0.089 |

【図２Ａ】

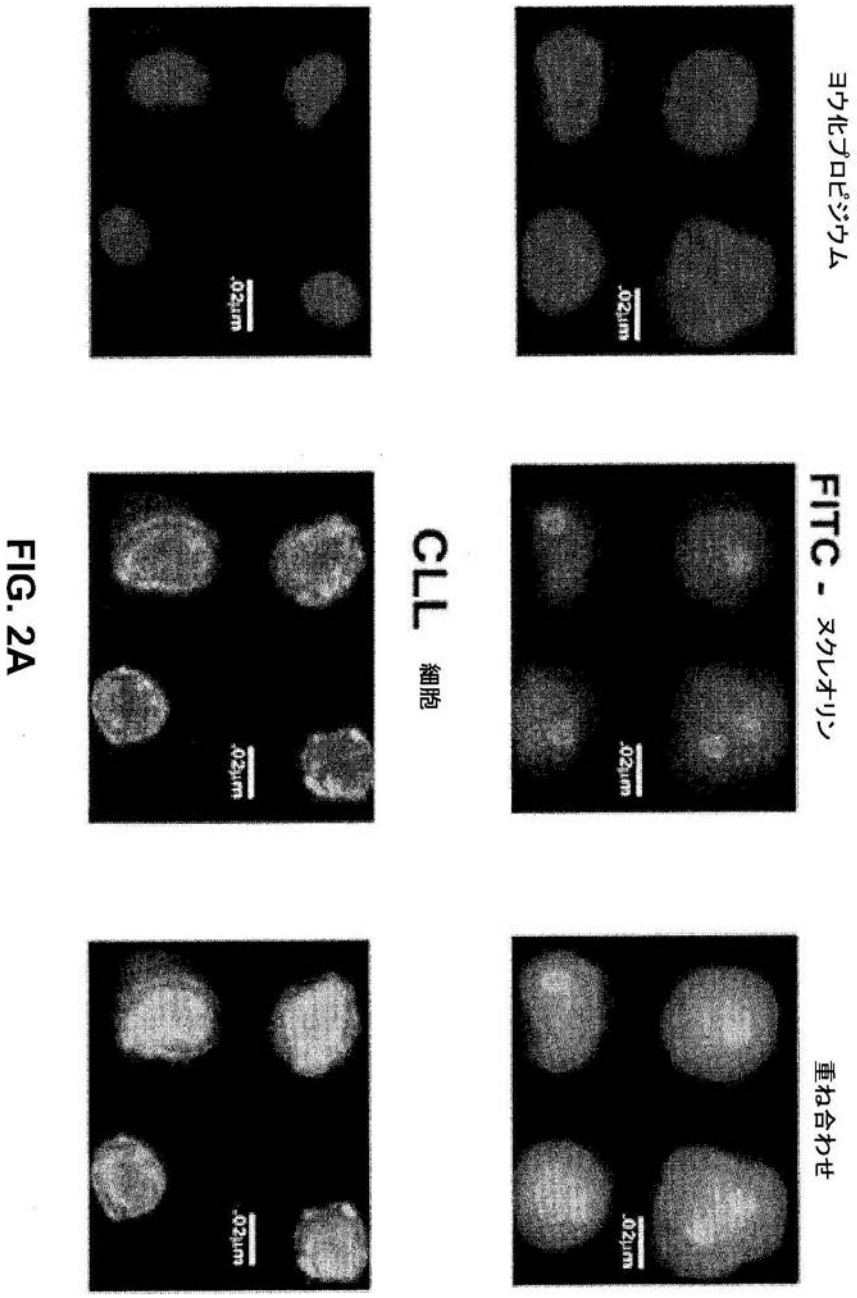


FIG. 2A

【図２Ｂ】

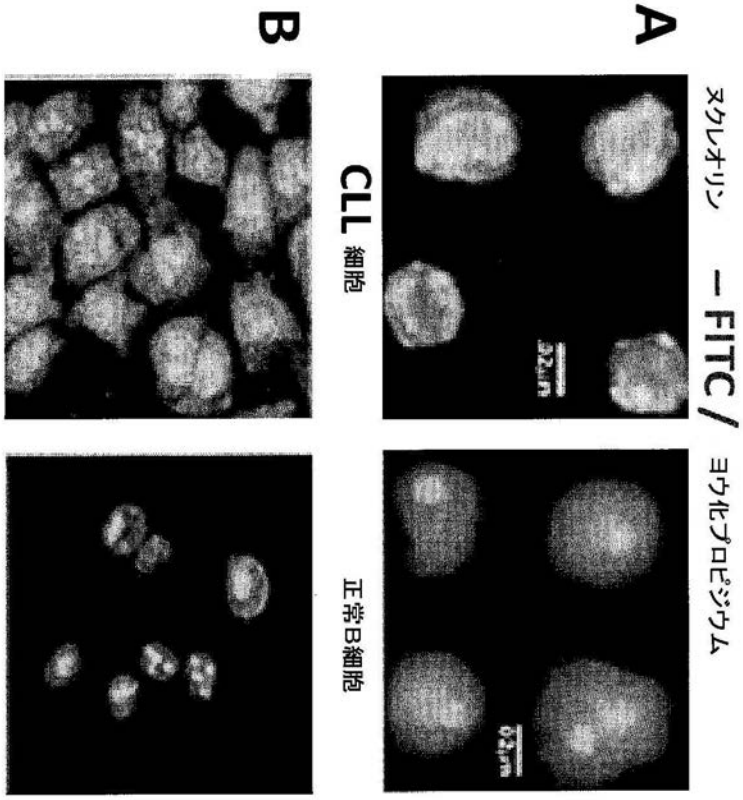


FIG. 2B

【図３】

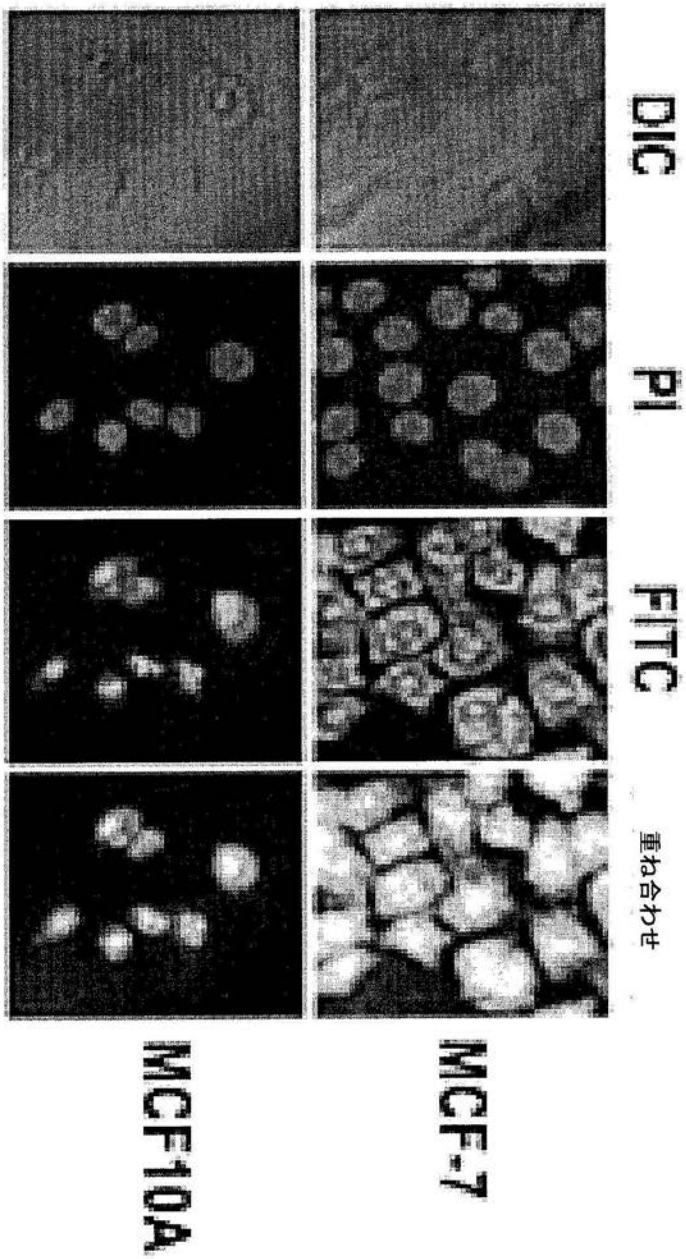


FIG. 3

【図５Ａ】

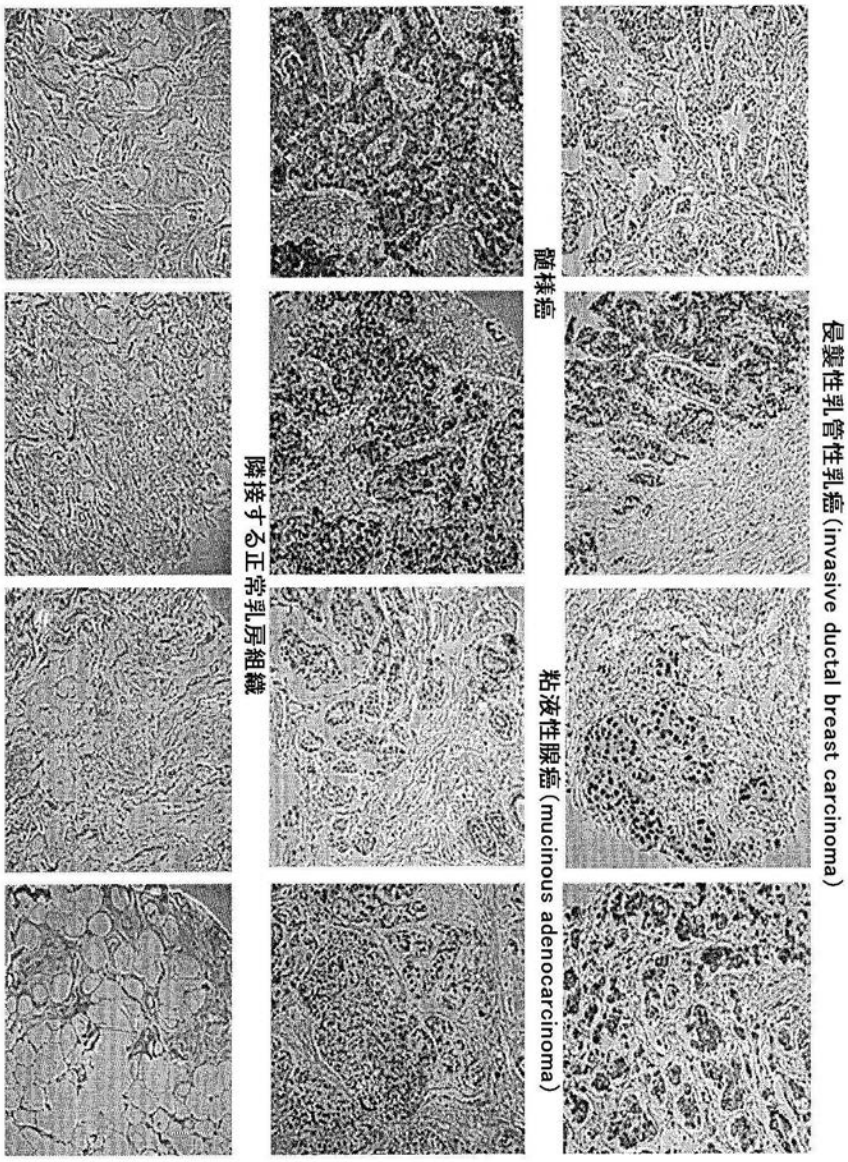
侵襲性乳管性乳癌（invasive ductal breast carcinoma）
髄様癌
粘液性腺癌（mucinous adenocarcinoma）
隣接する正常乳房組織

FIG. 5A

【図７】

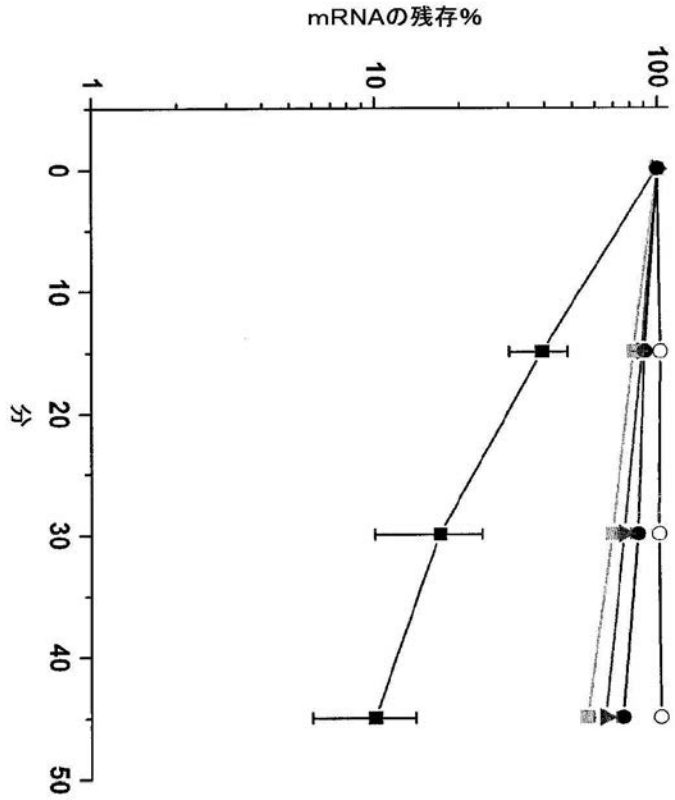


FIG. 7

【図８】

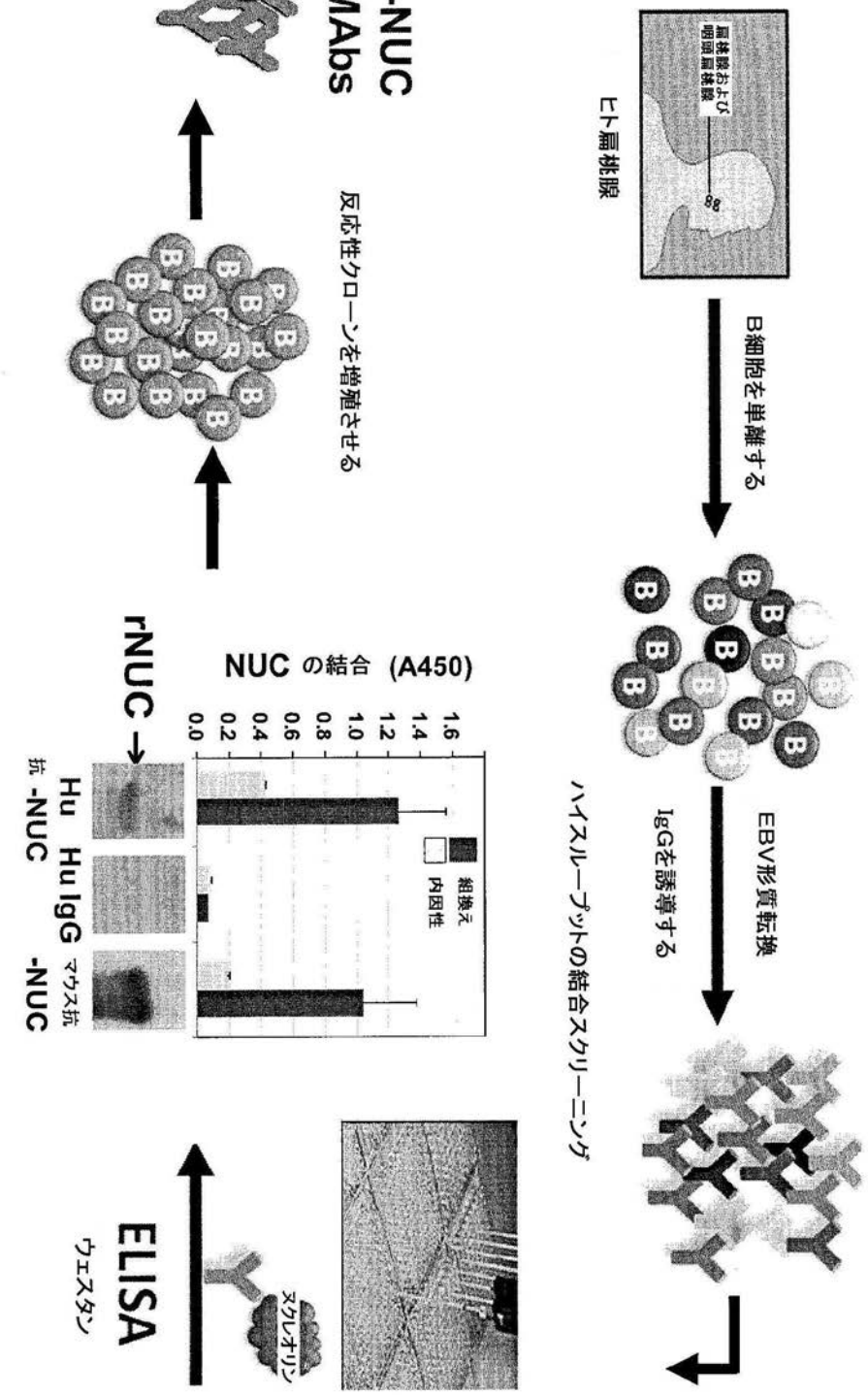
ヒト扁桃腺
扁桃腺および咽頭扁桃腺
B細胞を単離する
EBV形質転換
IgGを誘導する
ハイスループットの結合スクリーニング
ELISA
ウェスタン
スクレオリン
rNUC
Hu
Hu IgG
マウス抗
-NUC
抗
-NUC
NUC の結合 (A450)
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
組換え
内因性
反応性クローンを増殖させる
HuMAbs
抗 -NUC

FIG. 8

【図９】

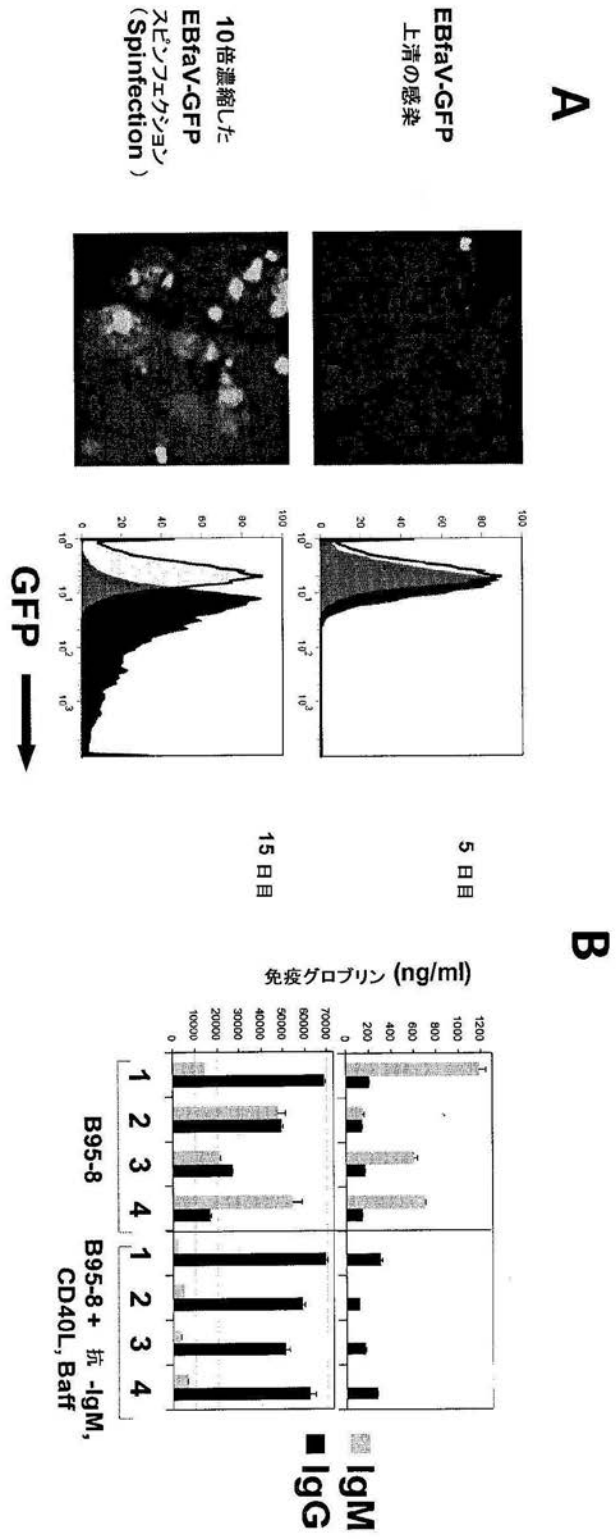
A
EBfaV-GFP
上清の感染
10倍濃縮した
EBfaV-GFP
スピンフェクション
（Spinfection）
GFP
5日目
15日目
B
免疫グロブリン (ng/ml)
IgM
IgG
B95-8
B95-8+ 抗 -IgM, CD40L, Baff
1 2 3 4
1 2 3 4

FIG. 9

【図１１】

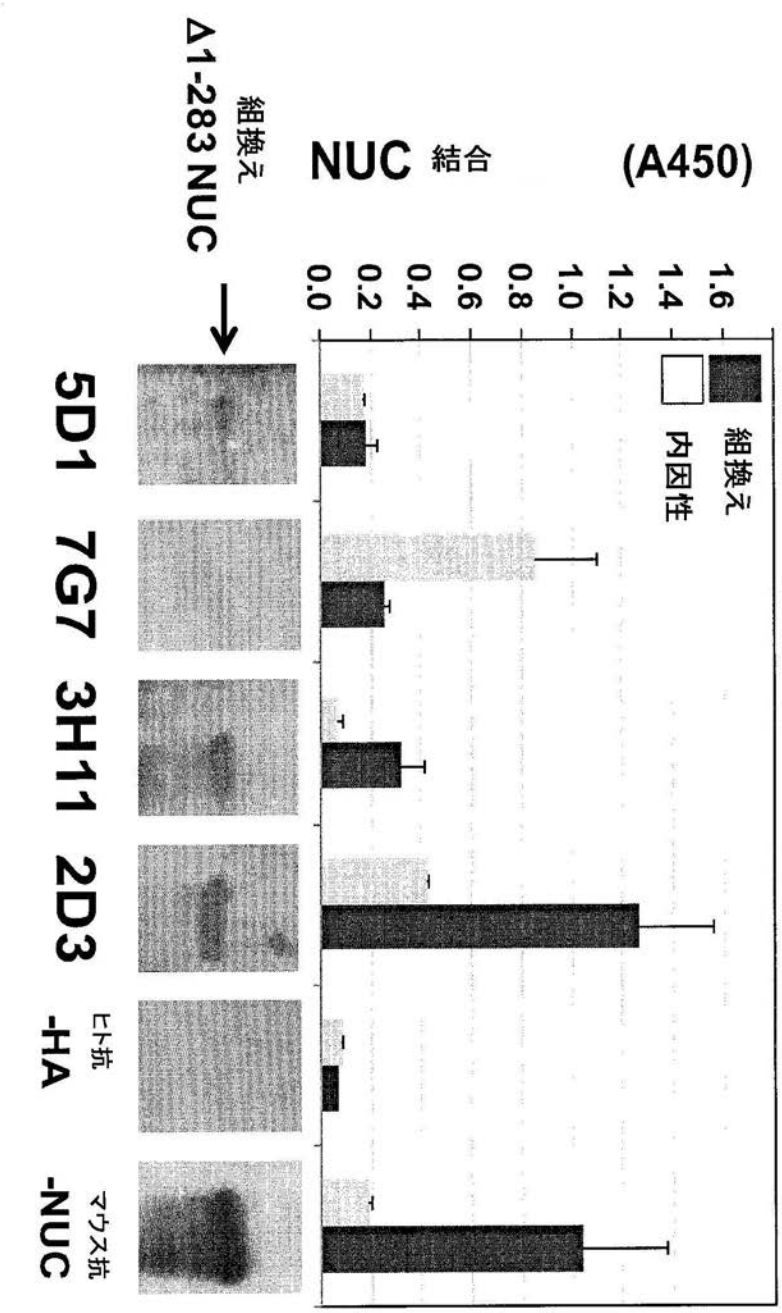
NUC 結合 (A450)
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
組換え
内因性
組換え
Δ1-283 NUC
5D1
7G7
3H11
2D3
ヒト抗
-HA
マウス抗
-NUC

FIG. 11

【図１２】

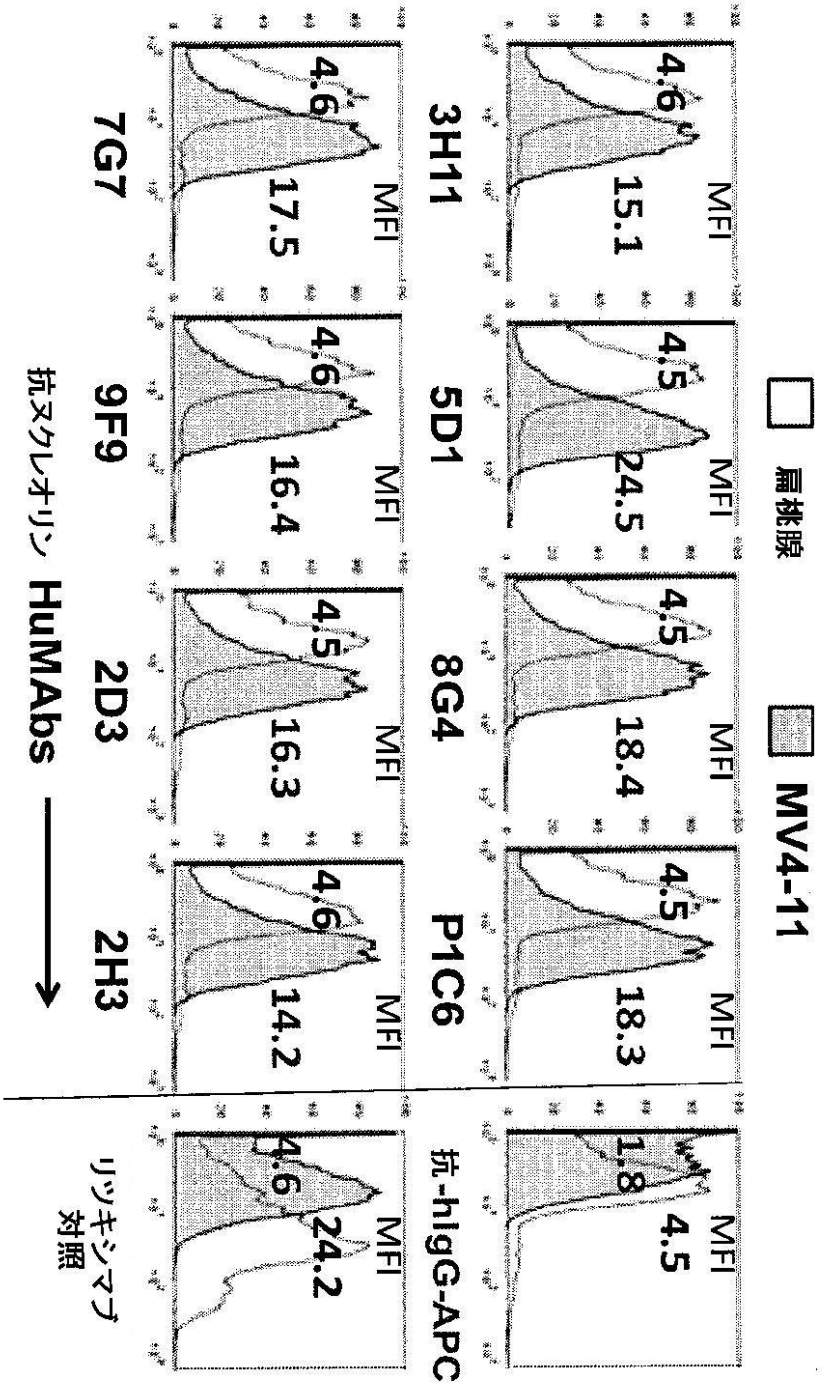
扁桃腺
MV4-11
抗ヌクレオリン HuMAbs
3H11
5D1
8G4
P1C6
7G7
9F9
2D3
2H3
抗-hIgG-APC
リツキシマブ
対照
MFI
4.6
15.1
4.5
24.5
4.5
18.4
4.5
18.3
4.5
1.8
4.6
17.5
4.6
16.4
4.5
16.3
4.6
14.2
4.6
24.2

FIG. 12

【図１３】

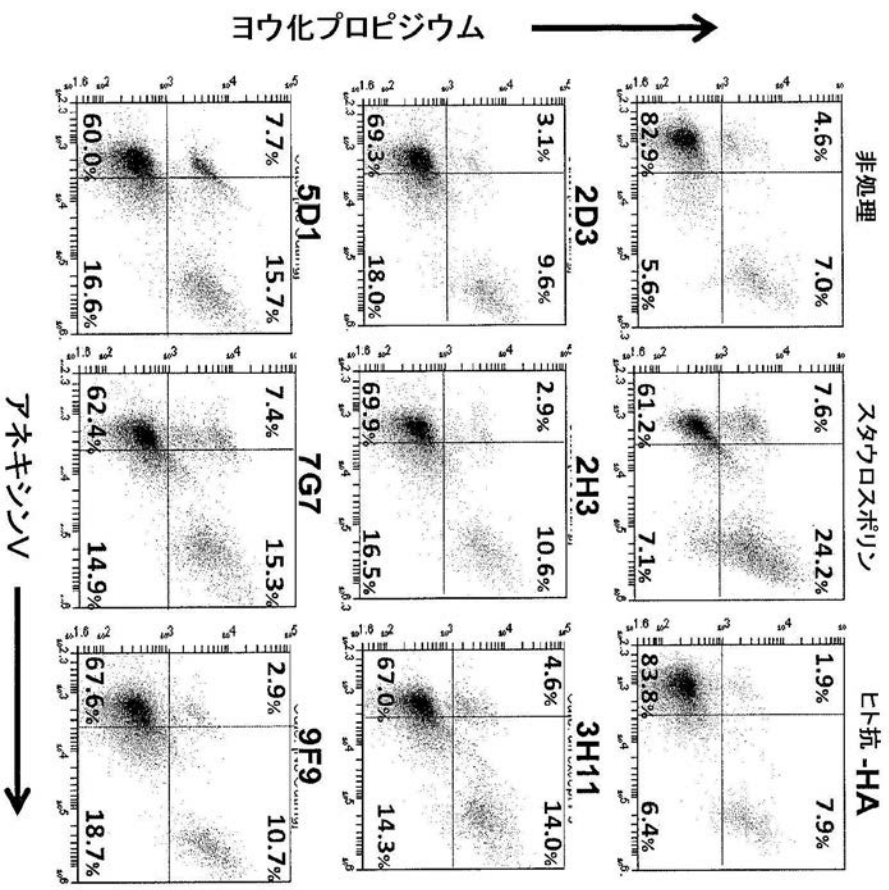
ヨウ化プロピジウム
アネキシンV
非処理
スタウロスポリン
ヒト抗 -HA
5D1
2D3
7G7
2H3
9F9
3H11
4.6%
7.0%
82.9%
5.6%
7.6%
24.2%
61.2%
7.1%
1.9%
7.9%
83.8%
6.4%
7.7%
15.7%
60.0%
16.6%
3.1%
9.6%
69.3%
18.0%
7.4%
15.3%
62.4%
14.9%
2.9%
10.6%
69.9%
16.5%
2.9%
10.7%
67.6%
18.7%
4.6%
14.0%
67.0%
14.3%

FIG. 13

【図１４Ａ】

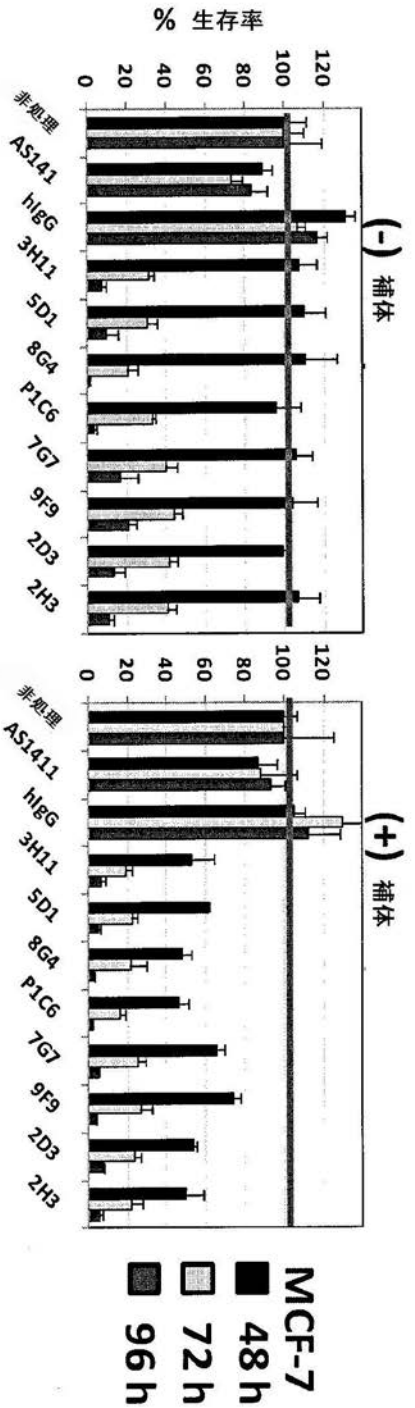
% 生存率
0
20
40
60
80
100
120
非処理
AS141
hIgG
3H11
5D1
8G4
P1C6
7G7
9F9
2D3
2H3
(-) 補体
非処理
AS1411
hIgG
3H11
5D1
8G4
P1C6
7G7
9F9
2D3
2H3
(+) 補体
MCF-7
48 h
72 h
96 h

FIG. 14A

【図１４Ｂ】

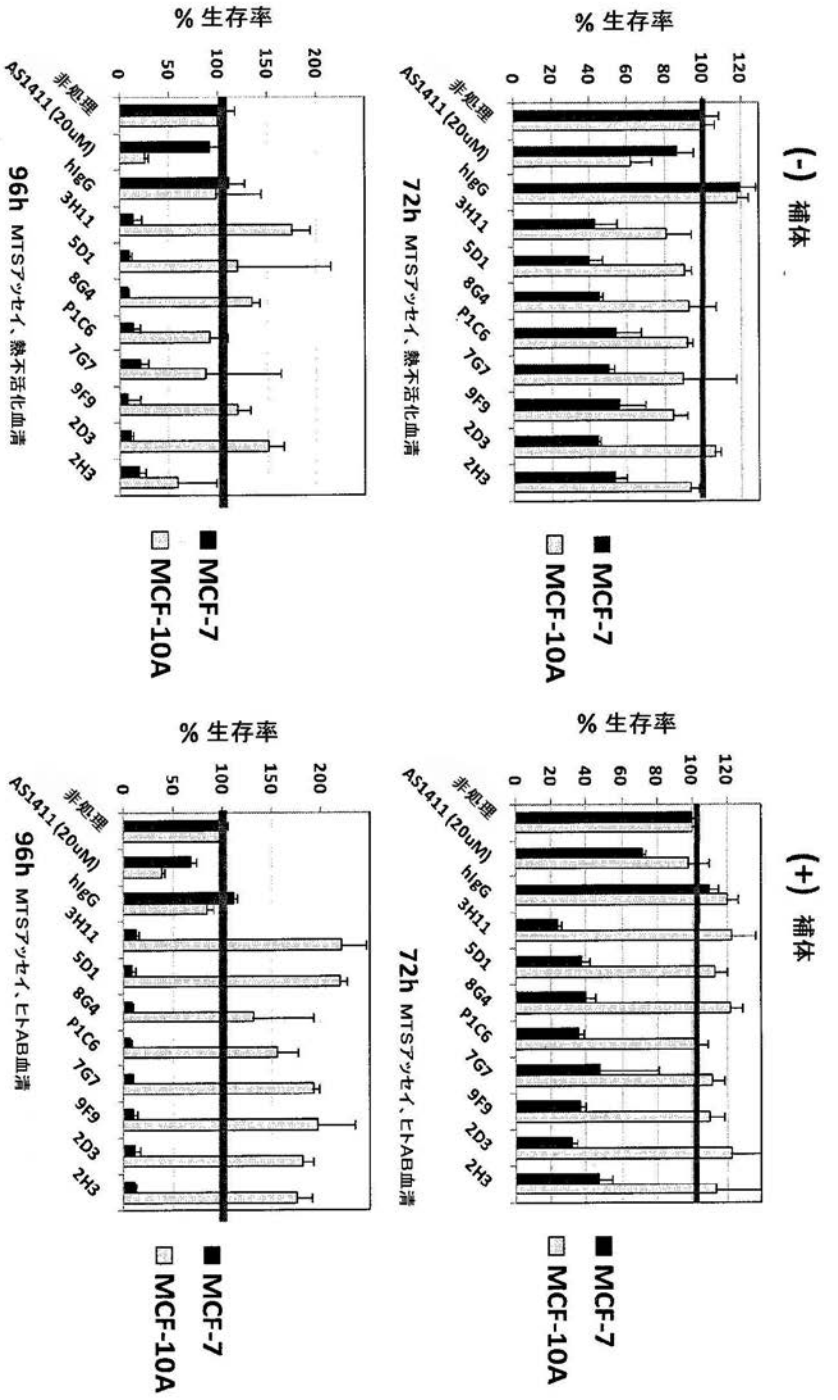
(-) 補体
(+) 補体
% 生存率
非処理
AS1411 (20uM)
hIgG
3H11
5D1
8G4
P1C6
7G7
9F9
2D3
2H3
72h MTSアッセイ、熱不活化血清
96h MTSアッセイ、熱不活化血清
72h MTSアッセイ、ヒトAB血清
96h MTSアッセイ、ヒトAB血清
MCF-7
MCF-10A

FIG. 14B

【図１４Ｃ】

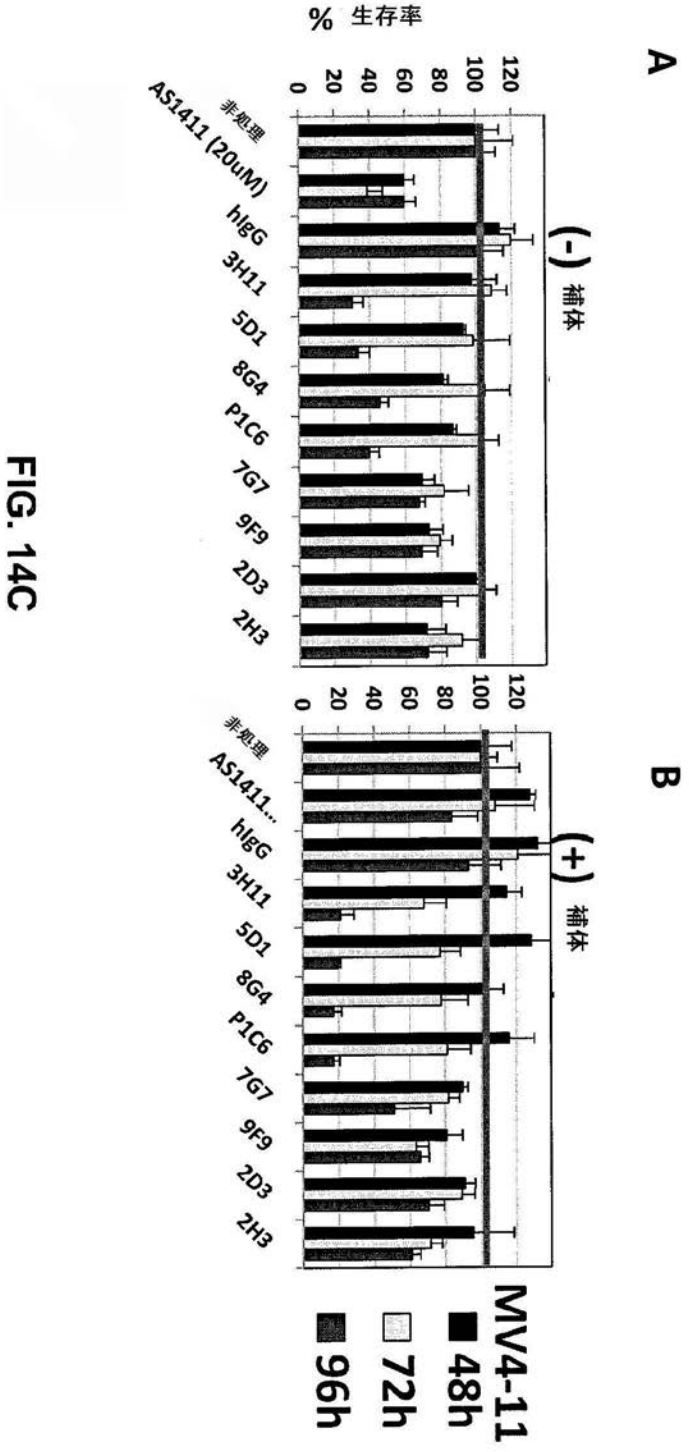


FIG. 14C

【配列表】
2013511260000001.app

【国際調査報告】

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US 10/57046

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C12N 5/00; C12P 21/08 (2011.01)
USPC - 435/325; 530/388.1
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8)- C12N 5/00; C12P 21/08 (2011.01)
USPC- 435/325; 530/388.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC- 435/455

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WEST (PGPB,USPT,EPAB,JPAB), Google Scholar, esp@cenet: nucleolin, immortal, B cell, class switch, interleukin, IgM, EBV, cytokine, cancer, antibody, lymphocyte, MUSC, Natalie Sutkowski

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | WO 2009/020923 A1 (SUTKOWSKI et al.) 12 February 2009 (12.02.2009) abstract; pg 2, ln 10-30; pg 3, ln 12-25; pg 42, ln 26-27; claim 1 | 1-20 |
| Y | US 2006/0258605 A1 (LUO et al.) 16 November 2006 (16.11.2006) para [0008], [0010], [0018], [0069], [0070] | 1-20 |
| A | US 6,165,786 A (BENNETT et al.) 26 December 2000 (26.12.2000) col 37, ln 37-41 | 1 |
| A | WO 2004/076677 A2 (LANZAVECCHIA) 10 September 2004 (10.09.2004) pg 1, ln 4-7 | 1 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 7 March 2011 (07.03.2011) | 09 MAY 2011 |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-3201 | Authorized officer:<br>Lee W. Young<br>PCT Helpdesk: 571-272-4300<br>PCT OSP: 571-272-7774 |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US 10/57046

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 26-30, 33-36,38-46, 89-90, 122-128, 133, 135-136
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I: claims 1-20, drawn to a method of producing an immortalized human B-cell that secrets an antibody that binds to human nucleolin by
(a) obtaining a population of IgM-positive human B-cells;
(b) contacting the population with: (i) Epstein-Barr virus (EBV) to immortalize the human B-cells, and (ii) a cytokine/growth factor/signaling agent cocktail to induce IgM-to-IgG immunoglobulin isotype class-switching; and
(c) culturing cells under conditions supporting the immortalization and immunoglobulin isotype class-switching.

Groups II-V, claims 21-25, 31-32, 37, 119-121, 132 , drawn to an immortalized human B-cell that expresses a IgG antibody that binds to human nucleolin, restricted to SEQ ID NO: 2, 1, 4, and 3, respectively.

--- Please see continuation extra sheet ----

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-20

**Remark on Protest**

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/57046

********** Supplemental Sheet **********

Continuation of Box (III): Lack of Unity

Group VI, claims 47-88, 91-98, 116-118, 129-131, drawn to an isolated antibody or fragment thereof that specifically binds to a human nucleolin protein, wherein the antibody or fragment thereof kills at least 20% of a population of MCF-7 cells, when incubated with the MCF-7 cells and human AB serum for 48 hours, and a method of using the antibody.

Group VII, claims 99-115, 134, drawn to a method of detecting a cell expressing nucleolin on its surface comprising contacting the cell with a human antibody or fragment thereof that binds immunologically to the nucleolin.

The inventions listed as Groups I-VII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The inventions of Groups I-V and VII do not include the inventive concept of an isolated antibody or fragment thereof that specifically binds to a human nucleolin protein, wherein the antibody or fragment thereof kills at least 20% of a population of MCF-7 cells, when incubated with the MCF-7 cells and human AB serum for 48 hours, as required by Group VI.

The inventions of Groups I and VI-VII do not include the inventive concept of an immortalized human B-cell that expresses a IgG antibody that binds to a specifically defined fragment of human nucleolin, as required by Groups II-V.

The inventions of Groups I -VI do not include the inventive concept of a method of detecting a cell expressing nucleolin on its surface comprising contacting the cell with a human antibody or fragment thereof that binds immunologically to the nucleolin, as required by Group VII.

The inventions of Groups I-VII share the technical feature of an immortalized human B-cell that secrets an antibody that binds to human nucleolin. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being obvious over WO 2009/020923 A1to Sutkowski, et al. (hereinafter "Sutkowski") (12 February 2009) in view of US 2006/0258605 A1 to LUO et al. (hereinafter "Luo") as follows:

Sutkowski discloses a method of producing an immortalized human B-cell that secrets an antibody that binds to an antigen (Abstract, "methods of producing human monoclonal antibodies against a wide variety of antigens including bacterial and viral antigens, as well as tumor antigens, and various autoantigens. Also provided are the antibodies themselves, nucleic acids encoding such antibodies, cells producing such antibodies"; claim 1, "method of producing an immortalized human B-cell secreting an antibody specific for a predetermined antigen comprising:
(a) obtaining a population of IgM -posltive human B-cells; (b) contacting the population with: (i) Epstein-Barr virus (EBV) to immortalize the human B-cells, and (ii) a cytokine/growth factor/signaling agent cocktail to induce
IgM-to-IgG immunoglobulin isotype class-switching; and (c) culturing cells under conditions supporting the immortalization and immunoglobulin isotype class-switching").
Sutkowski does not disclose an antibody specific to human nucleolin.
Luo discloses an antibody specific to human nucleolin (para [0069], "In preferred embodiments, the present invention provides monoclonal antibodies that specifically bind to NL").
It would have been obvious to a person skilled in the art how to produce the antibody specific to nucleolin taught by Luo using the method of Sutkowski without undue experimentation, thereby achieving an economically feasible production of humanized anti-nucleic monoclonal antibodies, useful for diagnostic and therapeutic applications (Sutkowski, pg 42, ln 25-27; Luo (abstract; para [0008]) As the an immortalized human B-cell that secrets an antibody that binds to human nucleolin would have been obvious at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Another technical feature of the inventions listed as Groups II-V is the specific amino acid or nucleic acid sequence recited therein. The inventions do not share a special technical feature, because 1) no significant structural similarities can readily be ascertained among an amino acid and a nucleic acid sequences, 2) US 2007/0224201 A1 to WU, et al. discloses the claimed amino acid of SEQ ID NO:2 (SEQ ID NO 1005), and 3) US 2009/0215178 A1( Tang) (27 August 2009) discloses the claimed nucleic acid of SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO 1506). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I-VII therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | | FI | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *G01N* | *33/574* | *(2006.01)* | G01N | 33/574 | A | |
| *C07K* | *16/32* | *(2006.01)* | C07K | 16/32 | ZNA | |
| *A61K* | *47/48* | *(2006.01)* | A61K | 47/48 | | |
| *A61P* | *35/00* | *(2006.01)* | A61P | 35/00 | | |
| *A61K* | *51/00* | *(2006.01)* | A61K | 49/02 | A | |
| *A61K* | *49/00* | *(2006.01)* | A61K | 49/00 | A | |
| *A61K* | *39/395* | *(2006.01)* | A61K | 39/395 | N | |
| *A61K* | *45/00* | *(2006.01)* | A61K | 39/395 | T | |
| | | | A61K | 43/00 | | |
| | | | A61K | 45/00 | | |

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

(72)発明者 ストコウスキー, ナタリー
アメリカ合衆国 サウスカロライナ ２９４２５, チャールストン, ピーオー ボックス ２５０５０４, アシュリー アベニュー １７３, ホーリングス キャンサー センター メディカル ユニバーシティー オブ サウスカロライナ
(72)発明者 フェルナンデス, ダニエル
アメリカ合衆国 サウスカロライナ ２９４２５, チャールストン, ピーオー ボックス ２５０１９４, エムユーエスシー ファウンデーション フォー リサーチ ディベロップメント 気付
(72)発明者 ホール, ブライアン
アメリカ合衆国 サウスカロライナ ２９４２５, チャールストン, ピーオー ボックス ２５０１９４, エムユーエスシー ファウンデーション フォー リサーチ ディベロップメント 気付
(72)発明者 ルブンチク, セミヨン
アメリカ合衆国 サウスカロライナ ２９４２５, チャールストン, ピーオー ボックス ２５０１９４, エムユーエスシー ファウンデーション フォー リサーチ ディベロップメント 気付

Fターム(参考) 4B065 AA93X AC14 BA23 BB19 BB34 BB40 CA25 CA44
4C076 CC27 EE41 EE59 FF70
4C084 AA12 AA19 MA16 MA34 MA52 MA55 NA14 ZB26
4C085 AA14 AA21 AA27 BB01 BB50 DD24 DD62 EE01 GG01 GG08
HH03 HH11 HH13 KA04 KA26 KA27 KA29 KB82 LL18
4H045 AA11 BA10 BA71 BA72 CA41 DA76 EA28 EA51 FA72

| | | | |
|---|---|---|---|
| 专利名称(译) | 抗人核仁素的人单克隆抗体 | | |
| 公开(公告)号 | JP2013511260A | 公开(公告)日 | 2013-04-04 |
| 申请号 | JP2012539082 | 申请日 | 2010-11-17 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 南卡罗来纳医科大学研究发展基金会 | | |
| 申请(专利权)人(译) | エムユーエスシーファウンデーションフォーリサーチディベロップメント | | |
| [标]发明人 | ストコウスキーナタリー<br>フェルナンデスダニエル<br>ホールブライアン<br>ルブンチクセミヨン | | |
| 发明人 | ストコウスキー, ナタリー<br>フェルナンデス, ダニエル<br>ホール, ブライアン<br>ルブンチク, セミヨン | | |
| IPC分类号 | C12N5/10 G01N33/53 G01N33/533 G01N33/535 G01N33/534 G01N33/574 C07K16/32 A61K47/48 A61P35/00 A61K51/00 A61K49/00 A61K39/395 A61K45/00 | | |
| CPC分类号 | C07K16/18 C07K16/30 C07K16/3015 C07K16/303 C07K16/3038 C07K16/3069 C07K2317/21 C07K2317/73 C07K2317/734 A61K47/6843 C07K16/28 C07K2317/76 | | |
| FI分类号 | C12N5/00.102 G01N33/53.N G01N33/533 G01N33/535 G01N33/534 G01N33/574.A C07K16/32.ZNA A61K47/48 A61P35/00 A61K49/02.A A61K49/00.A A61K39/395.N A61K39/395.T A61K43/00 A61K45/00 | | |
| F-TERM分类号 | 4B065/AA93X 4B065/AC14 4B065/BA23 4B065/BB19 4B065/BB34 4B065/BB40 4B065/CA25 4B065/CA44 4C076/CC27 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF70 4C084/AA12 4C084/AA19 4C084/MA16 4C084/MA34 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/NA14 4C084/ZB26 4C085/AA14 4C085/AA21 4C085/AA27 4C085/BB01 4C085/BB50 4C085/DD24 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG08 4C085/HH03 4C085/HH11 4C085/HH13 4C085/KA04 4C085/KA26 4C085/KA27 4C085/KA29 4C085/KB82 4C085/LL18 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA71 4H045/BA72 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA72 | | |
| 代理人(译) | 夏木森下 | | |
| 优先权 | 61/261909 2009-11-17 US | | |
| 其他公开文献 | JP6174320B2<br>JP2013511260A5 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |


摘要(译)

本发明提供了产生针对人核仁素的人单克隆抗体的方法，产生这种抗体的细胞和抗体本身。还提供了使用抗体诊断和治疗恶性和非恶性疾病的方法，其中在细胞表面表达核仁素的细胞有助于疾病的病理生理学。

| 配列番号 | ID | 配列 |
|---|---|---|
| 1 | ヒトヌクレオリシー下配列<br><br>受託番号<br>NM_005381<br>XM_002342275 | CTTTCGCCTCAGTCTCGAGCTCTCGCTGGCCTTCGGG<br>TGTACGTGCTCCGGGATCTTCAGCACCCGCGGCCGCC<br>ATCGCCGTCGCTTGGCTTCTTCTGGACTCATCTGCGC<br>CACTTGTCCGCTTCACACTCCGCCGCCATCATGGTGA<br>AGCTCGCGAAGGCAGGTAAAAATCAAGGTGACCCCA<br>AGAAAATGGCTCCTCCTCCAAAGGAGGTAGAAGAAG<br>ATAGTGAAGATGAGGAAATGTCAGAAGATGAAGAAG<br>AIGATAGCAGTGGAGAAGAGGTCGTCATACCTCAGA<br>AGAAAGGCAAGAAGGCTGCTGCAACCTCAGCAAAGA<br>AGGTGGTCGTTCCCCAACAAAAAAGGTTGCAGTTGC<br>CACACCAGCCAAGAAAGCAGCTGTCACTCCAGGCAA<br>AAAGGCAGCAGCAACACCTGCCAAGAAGACAGTTAC<br>ACCAGCCAAAGCAGTTACCACACCTGGCAAGAAGGG<br>AGCCACACCAGGCAAAGCATTGGTAGCAACTCCTGG<br>TAAGAAGGGTGCTGCCATCCCAGCCAAGGGGCAAA<br>GAATGGCAAGAATGCCAAGAAGGAAGACAGTGATG<br>AAGAGGAGGATGATGACAGTGAGGAGGATGAGGAG<br>GATGACGAGGACGAGGATGAGGATGAAGATGAAATT<br>GAACCAGCAGCGATGAAAGCAGCAGCTGCTGCCCCT<br>GCCTCAGAGGATGAGGACGATGAGGATGACGAAGAT<br>GATGAGGATGACGATGACGATGAGGAAGATGACTCT<br>GAAGAAGAAGCTATGGAGACTACACCAGCCAAAGGA<br>AAGAAAGCTGCAAAAGTTGTTCCTGTGAAAGCCAAG<br>AACGTGGCTGAGGATGAAGATGAAGAAGAGGATGAT<br>GAGGACGAGGATGACGACGACGACGAAGATGATGA<br>AGATGATGATGATGAAGATGATGAGGAGGAGGAAG<br>AAGAGGAGGAGGAAGAGCCTGTCAAAGAAGCACCT<br>GGAAACGAAAGAAGGAAATGGCCAAACAGAAAGC<br>AGCTCCTGAAGCCAAGAAACAGAAAGTGGAAGGCAC<br>AGAACCGACTACGGCTTTCAATCTCTTGTTGGAAAC<br>CTAAACTTTAACAAATCTGCTCCTGAATTAAAAACTG<br>GTATCAGCGATGTTTTTGCTAAAAATGATCTTGCTGT<br>TGTGGATGTCAGAATTGGTATGACTAGGAAATTTGGT<br>TATGTGGATTTTGAATCTGCTGAAGACCTGGAGAAAG<br>CGTTGGAACTCACTGGTTTGAAAGTCTTTGGCAATGA<br>AATTAAACTAGAGAAACCAAAAGGAAAAGACAGTTA<br>AGAAAGAGCGAGATGCGAGAACACTTTGGCTAAAA<br>ATCTCCCTTACAAAGTCACTCACGATGAATTGAAAGA<br>AGTGTTTGAAGATCGTGCGGAGATCAGATTAGTCAG<br>CAAGGATGGGAAAAGTAAAGGGATTGCTTATATTGA<br>ATTTAAGACAGAAGCTGATGCAGAGAAAACCTTTGA<br>AGAAAGCAGGGAACAGAGATCGATGGGCGATCTAT<br>TTCCCTGTACTATACTGGAGAGAAAGGTCAAAATCA<br>AGACTATAGAGGTGGAAAGAATAGCACTTGGAGTGG<br>TGAATCAAAAACTCTGGTTTTAAGCAACCTCTCCTAC<br>AGTGCAACAGAAGAAACTCTTCAGGAAGTATTTGAG<br>AAAGCAACTTTATCAAAGTACCCCAGAACCAAAAT<br>GGCAAATCTAAAGGGTATGCATTTATAGAGTTTGCTT<br>CATTCGAAGACGCTAAAGAAGCTTTAAATTCCTGTAA<br>TAAAGGGAATTGAGGGCAGAGCAATCAGGCTGGA<br>GTTGCAAGGACCCAGGGGATCACCTAATGCCAGAAG<br>CCAGCCATCCAAACTCTGTTTGTCAAGGCCTGTCT<br>GAGGATACCACTGAAGAGACATTAAAGGAGTCATTT |