

(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2005-536199

(P2005-536199A)

(43) 公表日 平成17年12月2日(2005.12.2)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	L 4 B O 6 4
A 6 1 K 51/00	A 6 1 K 39/395	N 4 B O 6 5
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	4 C O 8 5
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 27/02	4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-518132 (P2004-518132)	(71) 出願人	503232960 サビエント ファーマシューティカルズ, インコーポレイティド アメリカ合衆国, ニュージャージー 08 816 イースト ブランズウィック, タ ワー センター ブールバード 1
(86) (22) 出願日	平成15年6月30日 (2003. 6. 30)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(85) 翻訳文提出日	平成17年2月28日 (2005. 2. 28)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/020602	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(87) 国際公開番号	W02004/003166	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(87) 国際公開日	平成16年1月8日 (2004. 1. 8)		
(31) 優先権主張番号	10/189, 032		
(32) 優先日	平成14年7月1日 (2002. 7. 1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体及びそれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、癌細胞に結合し、並びに細胞ローリング及び転移のような生理的現象において重要である、抗体又はそれらの断片を提供する。このような抗体又はそれらの断片を使用する治療及び診断、予後判定又は病期決定の方法及び組成物も提供されている。本発明の方法及び組成物は、腫瘍増殖及び転移を含む癌、白血病、自己免疫疾患、及び炎症疾患などような疾患の診断及び治療において有用であることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

PSGL-1のエピトープに結合する抗体又はそれらの断片であり、ここで抗体又はそれらの断片は、配列番号:1のscFvの結合能を有する、抗体又はそれらの断片。

【請求項2】

抗体又はそれらの断片が、配列番号:2、配列番号:3、及び配列番号:4からなる群より選択される1個の重鎖相補性決定領域(CDR)を含む、請求項1記載の抗体又はそれらの断片。

【請求項3】

2個の重鎖CDRが、配列番号:2、配列番号:3、及び配列番号:4からなる群より選択される、請求項2記載の抗体又はそれらの断片。

10

【請求項4】

3個の重鎖CDRが、配列番号:2、配列番号:3、及び配列番号:4からなる群より選択される、請求項3記載の抗体又はそれらの断片。

【請求項5】

抗体又はそれらの断片が配列番号:1を含む、請求項4記載の抗体又はそれらの断片。

【請求項6】

配列番号:2、配列番号:3、及び配列番号:4からなる群より選択される1個の重鎖相補性決定領域(CDR)を含む、PSGL-1のエピトープに結合する、抗体又はそれらの断片。

【請求項7】

2個の重鎖CDRが、配列番号:2、配列番号:3、及び配列番号:4からなる群より選択される、請求項6記載の抗体又はそれらの断片。

20

【請求項8】

3個の重鎖CDRが、配列番号:2、配列番号:3、及び配列番号:4からなる群より選択される、請求項7記載の抗体又はそれらの断片。

【請求項9】

配列番号:1を含むPSGL-1エピトープに結合する、抗体又はそれらの断片。

【請求項10】

抗体又はそれらの断片が、生殖細胞系DP32由来の少なくとも1個のフレームワーク可変領域を含む、請求項1記載の抗体又はそれらの断片。

【請求項11】

抗体又はそれらの断片が、実質的に環状又はループ状のペプチド又はポリペプチドである、請求項1記載の抗体又はそれらの断片。

30

【請求項12】

エピトープが、少なくとも1個の硫酸化された部分を含む、請求項1記載の抗体又はそれらの断片。

【請求項13】

抗体又はそれらの断片が、2種又はそれよりも多いエピトープに結合し、各エピトープは、1個又はそれよりも多い硫酸化チロシン残基を含む、請求項1記載の抗体又はそれらの断片。

【請求項14】

各エピトープが、2種又はそれよりも多い酸性アミノ酸の少なくとも1種のクラスターを含む、請求項13記載の抗体又はそれらの断片。

40

【請求項15】

抗体又はそれらの断片が、2種又はそれよりも多いエピトープと交差反応し、各エピトープは、1個又はそれよりも多い硫酸化チロシン残基を有する、請求項1記載の抗体又はそれらの断片。

【請求項16】

各エピトープは、2種又はそれよりも多い酸性アミノ酸の少なくとも1種のクラスターを含む、請求項15記載の抗体又はそれらの断片。

【請求項17】

50

抗体又はそれらの断片が、T-ALL細胞、AML細胞、B-白血病細胞、B-CLL、及び多発性骨髄腫細胞からなる群より選択される少なくとも1種の細胞型上のエピトープに結合する、請求項1記載の抗体又はそれらの断片。

【請求項18】

抗体又はそれらの断片が、脂質、糖質、ペプチド、糖脂質、糖蛋白質、リポ蛋白質、及び/又はリポ多糖分子上のエピトープに結合する、請求項1記載の抗体又はそれらの断片。

【請求項19】

抗体又はそれらの断片が、抗癌剤、抗白血病物質、抗転移薬、抗新生物薬、疾患治療薬、抗接着薬、抗血栓薬、抗再狭窄薬、自己免疫疾患治療薬、抗凝集薬、抗菌剤、抗ウイルス薬、及び抗炎症薬からなる群より選択される物質と結合又は複合体化された、請求項1記載の抗体又はそれらの断片。

10

【請求項20】

物質が、アシクロビル、ガンシクロビル及びジドブジンからなる群より選択される抗ウイルス薬である、請求項19記載の抗体又はそれらの断片。

【請求項21】

物質は、シロスタゾール、ダルテパリンナトリウム、レビパリンナトリウム、及びアスピリンからなる群より選択される抗血栓/抗再狭窄薬である、請求項19記載の抗体又はそれらの断片。

【請求項22】

物質は、ザルトプロフェン、プラノプロフェン、ドロキシカム、アセチルサリチル酸17、ジクロフェナック、イブプロフェン、デキシブプロフェン、スリンダック、ナプロキセン、アムトルメチン、セレコキシブ、インドメタシン、ロフェコキシブ、及びニメスリドからなる群より選択される抗炎症薬である、請求項19記載の抗体又はそれらの断片。

20

【請求項23】

物質は、レフルノミド、デニロイキンジフチトックス、スプレウム、WinRho SDF、デフィプロチド、及びシクロホスファミドからなる群より選択される自己免疫疾患治療薬である、請求項19記載の抗体又はそれらの断片。

【請求項24】

物質は、リマプロスト、クロルクロメン、及びヒアルロン酸からなる群より選択される抗接着/抗凝集薬である、請求項19記載の抗体又はそれらの断片。

30

【請求項25】

物質は、毒素、放射性同位元素、造影剤、及び医薬品からなる群より選択される、請求項19記載の抗体又はそれらの断片。

【請求項26】

毒素は、ゲロニン、シュードモナス(Pseudomonas)菌体外毒素(PE)、PE40、PE38、リシン、並びにそれらの修飾物及び誘導体からなる群より選択される、請求項25記載の抗体又はそれらの断片。

【請求項27】

放射性同位元素が、 α -線-放射体、ポジترون-放射体、x-線放射体、 γ -線-放射体、及び β -線-放射体からなる群より選択される、請求項25記載の抗体又はそれらの断片。

40

【請求項28】

放射性同位元素が、 111 インジウム、 113 インジウム、 99m レニウム、 105 レニウム、 101 レニウム、 99m テクネチウム、 121m テルリウム、 122m テルリウム、 125m テルリウム、 165 ツリウム、 167 ツリウム、 168 ツリウム、 123 ヨウ素、 126 ヨウ素、 131 ヨウ素、 133 ヨウ素、 81m クリプトン、 33 キセノン、 90 イットリウム、 213 ビスマス、 77 臭素、 18 フッ素、 95 ルテニウム、 97 ルテニウム、 103 ルテニウム、 105 ルテニウム、 107 水銀、 203 水銀、 67 ガリウム及び 68 ガリウムからなる群より選択される、請求項25記載の抗体又はそれらの断片。

【請求項29】

医薬品はアントラサイクリンである、請求項25記載の抗体又はそれらの断片。

50

【請求項30】

アントラサイクリンが、ドキソルビシン、ダウノルビシン、イダルビシン、デトルビシン、カルミノマイシン、エピルビシン、エソルビシン、モルホリノドキソルビシン、モルホリノダウノルビシン、及びメトキシモルホリニルドキソルビシンからなる群より選択される、請求項29記載の抗体又はそれらの断片。

【請求項31】

医薬品は、シスプラチン、タキソール、カリケアマイシン、ピンクリスチン、シタラビン(Ara-C)、シクロホスファミド、プレドニソロン、フルダラビン、クロラムブシル、インターフェロン、ヒドロキシ尿素、テモゾロミド、タリドミド、及びブレオマイシン、並びにそれらの誘導体及び組合せからなる群より選択される、請求項25記載の抗体又はそれらの断片。

10

【請求項32】

抗体又はそれらの断片は、1個以上の物質に結合又は複合体化することができるビヒクル又は担体と結合又は複合体化される、請求項19記載の抗体又はそれらの断片。

【請求項33】

ビヒクル又は担体が、デキストラン、親油性ポリマー、HPMA、及びリポソーム、並びにそれらの誘導体及び修飾物からなる群より選択される、請求項32記載の抗体又はそれらの断片。

【請求項34】

請求項1記載の抗体又はそれらの断片に結合するアミノ酸配列を含む単離されたエピトープ。

20

【請求項35】

単離されたエピトープが、少なくとも1個の硫酸化された部分を含む、請求項34記載の単離されたエピトープ。

【請求項36】

硫酸化された部分が、硫酸化チロシンである、請求項35記載の単離されたエピトープ。

【請求項37】

単離されたエピトープが、負帯電したアミノ酸のクラスターを含む、請求項34記載の単離されたエピトープ。

【請求項38】

クラスターが、成熟PSGL-1のアミノ酸1~17を含む、請求項37記載の単離されたエピトープ。

30

【請求項39】

請求項1記載の抗体又はそれらの断片をコードしている単離された又は精製されたポリヌクレオチド。

【請求項40】

請求項39記載のポリヌクレオチド配列を含む、発現ベクター。

【請求項41】

請求項40記載の発現ベクターを含む、組換え宿主細胞。

【請求項42】

細胞が、抗体又はそれらの断片を発現する、請求項41記載の組換え宿主細胞又はそれらの後代。

40

【請求項43】

請求項40記載の発現ベクターによる細胞のトランスフェクションを含む、組換え細胞の作成法。

【請求項44】

抗体又はそれらの断片の発現を可能にする条件下で、請求項41記載の細胞を培養することを含む、抗体又はそれらの断片の作成法。

【請求項45】

更に方法が、抗体もしくはそれらの断片を細胞又は細胞の培地から単離又は精製するこ

50

とを含む、請求項44記載の方法。

【請求項46】

請求項1記載の抗体又はそれらの断片及び医薬として許容できる担体を含有する、医薬組成物。

【請求項47】

請求項1記載の抗体又はそれらの断片及び造影剤を含む、診断、予後判定又は病期決定用キット。

【請求項48】

造影剤が放射性同位元素である、請求項47記載の診断、予後判定、又は病期決定用キット。

【請求項49】

請求項46記載の医薬組成物を、それが必要な患者に投与することを含む、疾患を治療する方法。

【請求項50】

請求項46記載の医薬組成物を、それが必要な患者に投与することを含む、細胞ローリングを治療する方法。

【請求項51】

請求項46記載の医薬組成物を、それが必要な患者に投与することを含む、炎症作用の改善、炎症の予防、炎症の治療、又は炎症進行の阻害の方法。

【請求項52】

請求項46記載の医薬組成物を、それが必要な患者に投与することを含む、感染症を治療する方法。

【請求項53】

感染症が、HIVにより引き起こされる、請求項52記載の方法。

【請求項54】

投与が、HIVの細胞侵入を防ぐ、請求項52記載の方法。

【請求項55】

請求項46記載の医薬組成物を、それが必要な患者に投与することを含む、自己免疫疾患を治療する方法。

【請求項56】

請求項46記載の医薬組成物を、それが必要な患者に投与することを含む、転移を治療する方法。

【請求項57】

請求項46記載の医薬組成物を、それが必要な患者に投与することを含む、腫瘍細胞の増殖及び/又は複製を治療する方法。

【請求項58】

請求項46記載の医薬組成物を、それが必要な患者に投与することを含む、腫瘍細胞の致死率を増大する方法。

【請求項59】

請求項46記載の医薬組成物を、それが必要な患者に投与することを含む、白血病細胞の増殖及び/又は複製を治療する方法。

【請求項60】

請求項46記載の医薬組成物を、それが必要な患者に投与することを含む、白血病細胞の致死率を増大する方法。

【請求項61】

請求項46記載の医薬組成物を、それが必要な患者に投与することを含む、罹患細胞の疾患治療薬による障害に対する感受性を変更する方法。

【請求項62】

請求項46記載の医薬組成物を、それが必要な患者に投与することを含む、腫瘍細胞の抗癌剤による障害に対する感受性を増加する方法。

10

20

30

40

50

【請求項 6 3】

請求項46記載の医薬組成物を、それが必要な患者に投与することを含む、白血病細胞の抗癌剤による障害に対する感受性を増大する方法。

【請求項 6 4】

請求項46記載の医薬組成物を、それが必要な患者に投与することを含む、腫瘍を有する患者における腫瘍細胞数の増加を阻害する方法。

【請求項 6 5】

請求項46記載の医薬組成物を、それが必要な患者に投与することを含む、腫瘍を有する患者における腫瘍細胞数を減少する方法。

【請求項 6 6】

請求項46記載の医薬組成物を、それが必要な患者に投与することを含む、白血病患者における白血病細胞数の増加を阻害する方法。

10

【請求項 6 7】

請求項46記載の医薬組成物を、それが必要な患者に投与することを含む、白血病患者における白血病細胞数を減少する方法。

【請求項 6 8】

請求項46記載の医薬組成物を、それが必要な患者に投与することを含む、抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)を誘起する方法。

【請求項 6 9】

請求項46記載の医薬組成物を、それが必要な患者に投与することを含む、ナチュラルキ

20

【請求項 7 0】

患者における疾患の診断又は予後判定の方法であり：

患者由来の細胞を含む試料を提供すること、及び

請求項1記載の抗体又はそれらの断片が患者の細胞に結合するかどうかを決定することを含み、これにより患者が疾患のリスクがあるか又は疾患を有することを示す、方法。

【請求項 7 1】

患者における炎症の診断又は予後判定の方法であり：

患者由来の細胞を含む試料を提供すること、及び

請求項1記載の抗体又はそれらの断片が患者の細胞に結合するかどうかを決定することを含み、これにより患者が炎症のリスクがあるか又は炎症を有することを示す、方法。

30

【請求項 7 2】

患者における感染症の診断又は予後判定の方法であり：

患者由来の細胞を含む試料を提供すること、及び

請求項1記載の抗体又はそれらの断片が患者の細胞に結合するかどうかを決定することを含み、これにより患者が感染症のリスクがあるか又は疾患を有することを示す、方法。

【請求項 7 3】

感染症がHIVにより引き起こされる、請求項72記載の方法。

【請求項 7 4】

患者における自己免疫疾患の診断又は予後判定の方法であり：

40

患者由来の細胞を含む試料を提供すること、及び

請求項1記載の抗体又はそれらの断片が患者の細胞に結合するかどうかを決定することを含み、これにより患者が自己免疫疾患のリスクがあるか又は疾患を有することを示す、方法。

【請求項 7 5】

患者における転移の診断、予後判定又は病期決定の方法であり：

患者由来の細胞を含む試料を提供すること、及び

請求項1記載の抗体又はそれらの断片が患者の細胞に結合するかどうかを決定することを含み、これにより患者が転移のリスクがあるか又は疾患を有することを示す、方法。

【請求項 7 6】

50

患者における腫瘍細胞の診断、予後判定又は病期決定の方法であり：

患者由来の細胞を含む試料を提供すること、及び

請求項1記載の抗体又はそれらの断片が患者の細胞に結合するかどうかを決定することを含み、これにより患者が腫瘍細胞のリスクがあるか又は疾患を有するかを示す、方法。

【請求項77】

患者における白血病の診断、予後判定又は病期決定の方法であり：

患者由来の細胞を含む試料を提供すること、及び

請求項1記載の抗体又はそれらの断片が患者の細胞に結合するかどうかを決定することを含み、これにより患者が白血病のリスクがあるか又は疾患を有することを示す、方法。

【請求項78】

患者から腫瘍細胞をパージする方法であり：

患者由来の細胞を含む試料を提供すること、及び

患者由来の細胞を請求項1記載の抗体又はそれらの断片と共にインキュベーションすることを含む、方法。

【請求項79】

パージが、*ex vivo*で行われる、請求項78記載の方法。

【請求項80】

疾患治療用のための医薬品製造における、請求項46記載の医薬組成物の使用。

【請求項81】

疾患が、細胞ローリング、炎症、自己免疫疾患、感染症、転移、腫瘍細胞の増殖及び／又は複製、並びに白血病細胞の増殖及び／又は複製からなる群より選択される、請求項80記載の使用。

【請求項82】

疾患の治療のための医薬品製造において使用するための、請求項46記載の医薬組成物。

【請求項83】

疾患が、細胞ローリング、炎症、自己免疫疾患、感染症、転移、腫瘍細胞の増殖及び／又は複製、並びに白血病細胞の増殖及び／又は複製からなる群より選択される、請求項82記載の医薬組成物。

【請求項84】

抗体又はそれらの断片の作成プロセスであり：

ファージディスプレイライブラリーを提供すること；

配列番号:1の断片のscFv抗体又はそれらの断片の結合能を有する抗体又はそれらの断片に結合する少なくとも2種の分子又は細胞を提供すること；

これらの少なくとも2種の分子又は細胞に結合するオリゴペプチド又はポリペプチドのファージ粒子ディスプレイに関するファージディスプレイライブラリーをパンニングすること；並びに

少なくとも2種の分子もしくは細胞に結合するペプチド又はポリペプチドを含む抗体又はそれらの断片又はそれらの結合断片を含む抗体又はそれらの断片を作成することを含む、方法。

【請求項85】

請求項84記載のプロセスに従い作成された抗体又はそれらの断片。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の技術分野

本発明は、癌細胞、転移細胞、白血病細胞、白血球、及び血小板のような、細胞上に存在し、並びに細胞ローリング、転移、炎症、及び自己免疫疾患のような多様な生理学的現象において重要である、特定のエピトープに結合する抗体に関する。特に、これらの抗体は、抗癌活性、抗転移活性、抗白血病活性、抗ウイルス活性、抗感染症活性、並びに／又は炎症性疾患、自己免疫疾患、心筋梗塞のような心臓血管系疾患、網膜症、及び硫酸化チ

10

20

30

40

50

ロシン-依存型蛋白質-蛋白質相互作用により惹起された疾患のような、他の疾患に対する活性を有する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

抗体、ファージディスプレイ、及び組織標的化

治療用物質の組織選択的標的化は、製薬産業における新興の分野である。標的化を基にした新規癌治療は、その治療の特異性及び効力を増大する一方で、毒性を低下し、これにより全般的効能が増強されるようにデザインされている。腫瘍関連抗原に対するマウスのモノクローナル抗体(MAb)が、毒素、放射性ヌクレオチド、及び腫瘍に対する化学療法複 10
合体の標的化の試みにおいて使用されている。加えて、CD19、CD20、CD22、及びCD25のような分化抗原は、造血系悪性疾患の治療における癌特異的標的として利用されている。

【0003】

集中的研究にもかかわらず、この方法にはいくつかの制約がある。ひとつの制約は、選択的結合を示している適当なMAbの単離が困難であることである。第二の制約は、うまく抗体単離するための前提条件として、高い抗体免疫原性が必要であることである。第三の制約は、最終生成物は非-ヒト配列を有し、これは免疫応答を誘導することであり；例えば、マウスMAbがヒトに投与された場合、ヒトの抗-マウス抗体(HAMA)反応が生じるであろう。HAMA反応は、比較的短い血清半減期を生じることが多く、反復治療を妨害し、その結果抗体の治療的価値を減らすことが多い。最後の制約は、マウス起源のキメラ又はヒト化 20
されたモノクローナル抗体を操作すること、及びヒト抗体を発見することの両方についての関心を刺激している。この方法の別の制約は、既知の精製された抗原のみに対する単独の抗体種のみが単離可能であることである。更にこの方法は、それが、正常細胞に加え悪性細胞上に存在する細胞表面マーカーに対する抗体の単離を可能にする限りにおいては、選択的ではない。

【0004】

癌治療に関するMAbの治療効力に影響を及ぼす多くの要因が存在する。これらの要因は、腫瘍細胞上の抗原発現の特異性及びレベル、抗原異原性、及び腫瘍塊への接近可能性を含む。白血病及びリンパ腫は一般に、抗体による治療に対し、癌腫のような固形腫瘍よりもより反応性である。MAbは、血流中の白血病細胞及びリンパ腫細胞に結合し、並びにリン 30
パ組織中の悪性細胞を容易に浸潤し、その結果リンパ系腫瘍がMAb-ベースの療法のための優れた候補となっている。理想的システムは、悪性の後代細胞を産生する幹細胞の細胞表面上のマーカーを認識するMAbを同定することを必然的に伴っている。

【0005】

ファージライブラリーは、単離され予め決定された標的蛋白質、例えば抗体、ホルモン、及び受容体に結合するランダムな単鎖可変領域抗体断片(scFv)を選択するために使用することができる。一般に抗体ディスプレイライブラリーの、及び特にファージscFvライブラリーの使用は、標的特異性が依然認められず決定されていない細胞表面部分について、独自の分子を発見することの代替手段を促進する。

【0006】

白血病、リンパ腫、及び骨髄腫は、骨髄及びリンパ組織に起源を有し並びに細胞の制御できない増殖に関連した癌である。急性リンパ芽球性白血病(ALL)は、特異的、臨床的及び免疫学的特徴により定義される異質性の疾患である。B細胞性ALL(B-ALL)のほとんどの症例の決定的原因は、ALLの他の型同様不明であるが；しかし、多くの症例において、この疾患は、単独の細胞のDNAにおける後天性の遺伝的変化から生じ、異常及び連続増殖を引き起こす。B-ALLに罹患した患者の予後は、小児及び成人の両方において、他の白血病の患者よりも著しく劣っている。慢性リンパ性白血病(CLL)の一例は、B細胞性CLL(B-CLL)であるが、これは白血病の緩徐な進行型であり、リンパ球数の増加により特徴付けられる。急性骨髄性白血病(AML)は、通常の条件で、骨髄系の最終分化した細胞(赤血球、顆粒球、単球、及び血小板)を生じる始原細胞を有する新生物の異質群である。AMLは、新生物の 40
50

他の型のように、正常に分化した骨髄細胞の、比較的未分化の芽球との置換を生じる、後天性の遺伝的变化に関連している、1種又はそれよりも多い初期骨髄系分化を示す。AMLは、一般に骨髄に、及びより少ない程度に二次造血器官において進行する。主としてAMLは、成人を冒し、及び好発年齢15～40歳であるが、これは小児及び高齢者の両方を冒すことも知られている。ほぼ全てのAML患者は、診断後、異常なレベルの未分化芽細胞の循環の証拠がない臨床的寛解を実現するために、直ちに治療されることを必要としている。

【0007】

今日まで、腫瘍細胞に対する細胞溶解活性を誘導する様々なMABが、開発されている。HER2(P185)の細胞外ドメインに対して産生され及びHER2を過剰発現しているヒト腫瘍細胞の顕著な増殖阻害が認められたマウスMAB muMab4D5はヒト化され、薬物HERCEPTIN(登録商標)(トラスツマブ)が製造され、これはFDAから承認され、及びヒト乳癌の治療に使用されている(米国特許第5,821,337号及び第5,720,954号)。結合後、抗体は、HER2増殖因子受容体に依存する腫瘍細胞増殖を阻害することが可能である。加えて、リンパ腫に関連したものを含む、末梢B細胞の迅速な枯渇を引き起こすCD20に対するキメラ抗体が、最近FDAにより承認された(米国特許第5,843,439号)。この抗体の標的細胞に対する結合は、補体-依存性溶解を生じる。この製品は最近承認され、及び低い段階(low-grade)のB細胞性非-ホジキンリンパ腫を治療するために臨床使用されている。

10

【0008】

いくつかの他のヒト化された抗体及びキメラ抗体が開発中であるか、又は臨床試験段階にある。例えば、正常骨髄細胞に加えほとんどの型の骨髄性白血病細胞型の両方において発現されたCD33抗原と特異的に作用するヒト化された免疫グロブリン(Ig)は、抗癌剤カリケアミシン、CMA-676に複合されている(Sieversら、Blood Supp.、308: 504a (1997))。薬物MYLOTARG(登録商標)として公知であるこの複合体は、最近FDA承認された(Caronら、Cancer Supp.、73: 1049-56 (1994))。その細胞溶解活性を考慮し、現在臨床試験中の別の抗-CD33抗体(HumM195)は、ゲロニン毒素(McGrawら、Cancer Immunol. Immunother.、39: 367-74 (1994))及び放射性同位元素¹³¹I(Caronら、Blood、83: 1760-68 (1994))、⁹⁰Y(Jurcicら、Blood Supp.、92: 613a (1998))及び²¹³Bi(Hummら、Blood Supplement、38: 231P (1997))を含む、いくつかの細胞毒素に複合されている。白血球抗原CD45に対するキメラ抗体(cHuLym3)も、ヒト白血病及びリンパ腫の治療に関して臨床試験中である(Sunら、Cancer Immunol. Immunother.、48: 595-602 (2000))。In vitroアッセイにおいて、特異

20

30

【0009】

これらの治療的抗体は、それらの標的に対し比較的高い親和性を有するように、より安定するように、及び最適な生体分布のために、特異的に操作されてもいる。例えば、Prestaの論文、Current Pharma. Biotechnol.、3: 237-56 (2002); Prestaらの論文、Biochem. Society Transactions、30(4): 487-90 (2002)を参照のこと。

【0010】

マウスモノクローナル性のヒト化及びキメラ抗体の構築とは対照的に、ファージディスプレイ技術の使用は、完全なヒト配列を有するscFvの単離を可能にしている。ヒトTGF β 2受容体に対する完全なヒト抗体が、最近ファージディスプレイ技術由来のscFvクローンを基に開発された。このscFvは、TGF β 2の結合に競合することが可能である完全なヒトIgG4に転換される(Thompsonら、J. Immunol. Meth.、227: 17-29 (1999))が、これは強力な抗-増殖活性を有する。当業者に公知のファージディスプレイ技術は、下記刊行物においてより詳細に説明されている: Smith、Science、228: 1315 (1985); Scottら、Science、249: 386-90 (1990); Cwirlaら、PNAS、87: 6378-82 (1990); Devlinら、Science、249: 404-06 (1990); Griffithsら、EMBO J.、13(14): 3245-60 (1994); Bassら、Proteins、8: 309-14 (1990); McCaffertyら、Nature、348: 552-54 (1990); Nissimら、EMBO J.、13: 692-98 (1994); 米国特許第5,427,908号、第5,432,018号、第5,223,409号及び第5,403,48

40

50

4号、lib.。

【0011】

単離されたscFv抗体分子のためのリガンド

血小板、フィブリノーゲン、GPIb、セレクチン、及びPSGL-1(P-セレクチン糖蛋白質リガンド-1)は各々、異常な又は病原性の炎症、異常な又は病原性の免疫応答、自己免疫反応、転移、異常な又は病原性の接着、血栓及び/又は再狭窄、並びに異常な又は病原性の凝集のような、いくつかの病原性の状態又は疾患状態において重要な役割を果たしている。従って、血小板及びこれらの分子と結合又は交差反応する抗体は、これら及び他の病原性の状態に関連した疾患及び障害の診断及び治療において有用であろう。

【0012】

血小板

血小板は、血液系の良く特徴付けられた成分であり、止血、血栓及び/又は再狭窄においていくつかの重要な役割を果たしている。血管に対する損傷は、一連の連続事象により特徴付けられる、止血として知られているプロセスにおいて活動するように設定されている。損傷を受けた血管に対する最初の反応は、血管内面上の冒された領域に対する血小板の接着である。次の工程は、先に接着された血小板上への血小板の多層凝集、止血性栓子の形成及び血管壁の閉鎖である。止血性栓子は、フィブリン高分子の付着により更に強化される。血塊又は栓子は、損傷が修復された場合にのみ分解される。

【0013】

循環する血小板は、巨核球の辺縁から放出された細胞質粒子である。血小板は、止血において重要な役割を果たす。血管損傷時に、血小板は、損傷した組織表面に接着し、及び互いに付着する(合着)。この一連の事象は迅速に生じ、血管損傷部位で無組織の塊(通常血小板栓子又は血栓と称される)を形成する。この合着現象は、凝集としても知られており、これは、*in vitro*において、様々な物質、又はアゴニスト、例えばコラーゲン、アデノシン-二リン酸(ADP)、エピネフリン、セロトニン、及びリストセチンなどにより開始され得る。凝集は、血小板機能の測定として行われる多くの*in vitro*試験のひとつである。

【0014】

転移における血小板の重要性

腫瘍転移は、恐らく癌患者の生存を制限する最も重要な因子であろう。蓄積されたデータは、腫瘍細胞の宿主血小板との相互作用能は、転移に必須の決定因子の一種を表すことを示している(Oleksowicz、Thrombosis Res.、79: 261-74 (1995))。転移性癌細胞が血流に侵入する場合に、腫瘍細胞をコートしている血小板及び白血球で構成された多細胞複合体が形成される。微小血栓と称されることもあるこれらの複合体は、腫瘍細胞が免疫系を回避することを補助する。血小板による腫瘍細胞のコティングは、血小板によるP-セレクチンの発現を必要としている。

【0015】

腫瘍細胞の血小板を凝集する能力は、腫瘍細胞の転移能に相関していることが明らかにされており、並びに腫瘍が誘導した血小板凝集の阻害は、齧歯類モデルにおける転移の抑制に相関していることが示されている。血小板との腫瘍細胞相互作用は、膜接着分子及びアゴニスト分泌に関連していることが明らかにされている。免疫に関連した血小板糖蛋白質の発現は、腫瘍細胞株上で同定されている。血小板免疫に関連した糖蛋白質、GPIb、GPIIb/IIIa、GPIb/IX及びインテグリン α_v のサブユニットは、乳癌細胞株の表面上に発現されることが明らかにされた(Oleksowicz、(1995)、前掲; Kamiyamaら、J. Lab. Clin. Med.、117(3): 209-17 (1991))。

【0016】

Gasicら(PNAS、61: 46-52 (1968))は、抗体が誘導した血小板減少症は、CT26結腸腺癌、Lewis肺癌、及びB16黒色腫により生じた転移の数及び容積を顕著に低下したことを示した(Karpatkinら、J. Clin. Invest.、81(4): 1012-19 (1988); Clezardinら、Cancer Res.、53(19): 4695-700(1993))。更に、単独のポリペプチド鎖(60kd)が、GPIbに密接に関連しているHEL細胞の表面膜上に発現され、並びにこれは不完全な又は異常なO-グリコシル

10

20

30

40

50

化されたGPIb サブユニットに対応していることが発見された(Kiefferら、J. Biol. Chem.、261(34): 15854-62 (1986))。

【0017】

GPIb複合体

止血プロセスの各工程は、血小板表面上の受容体の存在を必要としている。止血において重要であるひとつの受容体は、糖蛋白質Ib-IX複合体(CD42としても公知)である。この受容体は、内皮下層におけるフォン・ビルブラント因子(vWF)の結合による、損傷部位での血小板の血管壁への接着(最初の付着)を媒介する。これは、下記の止血に重要であるふたつの別の血小板機能において重要な役割も有する：(a)動脈狭窄領域における高剪断により誘導された血小板の凝集、及び(b)低濃度のトロンピンにより誘導された血小板活性化。

10

【0018】

GPIb-IX複合体は、血小板細胞膜の外側表面の主要成分のひとつである。この複合体は、3種の膜貫通ポリペプチドを含み - これは、GPIbのジスルフィド連結した130kDa 鎖及び25kDa 鎖、並びに非共有的に会合したGPIX(22kDa)である。これらのサブユニットは全て、CD42複合体の効率的細胞表面発現及び機能のために、血小板膜上に等モル量で提示されており、細胞膜上での完全な発現には、これら3種のサブユニットのひとつの複合体への適切な集成が必要であることを示している。GPIbの鎖は、3種の個別の構造ドメインからなる：(1)ロイシン-リッチ反復配列及びCys-結合したフランキング配列を含む球状N-末端ペプチドドメイン；(2)高グリコシル化されたムチン-様マクロ糖ペプチドドメイン；及び、(3)GPIbへのジスルフィド橋並びに膜貫通配列及び細胞質配列を含む、膜に会合したC末端領域。

20

【0019】

GPIb-IX複合体のvWF及びトロンピン-結合ドメインは、GPIbのアミノ末端に約300個のアミノ酸を包含している球状領域に存在することを示す証拠がいくつかある。ヒト血小板GPIb-IX複合体は血小板の機能及び反応性の両方を媒介する重要な膜受容体であるので、GPIbによる内皮下層に結合したvWFの認識は、血小板を、障害を受けた血管に接着させる。更にvWFのGPIbへの結合は、血小板活性化も誘導し、これはGPIb-IX細胞質ドメインの細胞骨格又はホスホリパーゼA2との相互作用に関連することがある。更にGPIbは、トロンピンへの高-親和性結合部位を含み、これは現在も余り定義されていない機構により血小板活性化を促進する。

30

【0020】

GPIbのN-末端球状ドメインは、負帯電したアミノ酸のクラスターを含む。証拠となるいくつかの系統は、GPIb-IX複合体を発現しているトランスフェクションされたCHO細胞において及び血小板GPIbにおいて、このドメインに含まれた3個のチロシン残基(Tyr-276、Tyr-278、及びTyr-279)は硫酸化を受けることを示している。

【0021】

蛋白質硫酸化

蛋白質硫酸化は、糖側鎖又はポリペプチド骨格のいずれかへの硫酸塩の酵素的共有結合が関与している広範な翻訳後修飾である。この修飾は、トランス-ゴルジコンパートメントにおいて生じる。硫酸化された蛋白質は、分泌蛋白質、顆粒に標的化される蛋白質、及び細胞膜蛋白質の細胞外領域を含む。チロシンは、硫酸化を受けることが現在わかっているアミノ酸残基である。Kehoeら、Chem. Biol.、7: R57-61 (2000)。他のアミノ酸、例えばトレオニンも、特に罹患した細胞において、硫酸化を受けることがある。

40

【0022】

多くの蛋白質は、チロシン-硫酸化されることがわかっているが、GPIbについて認められた、単独のポリペプチド中の3個又はそれよりも多い硫酸化されたチロシンの存在は一般的ではない。血小板及び巨核球により発現され、並びにvWFとの結合を介して内皮下層上への血小板付着及びその上でのローリングを媒介するGPIb (CD42)は、そのN-末端ドメインに多くの負帯電も含む。このような高度に酸性及び親水性の環境は、硫酸化の前提条

50

件であると考えられ、その理由は、チロシン硫酸化酵素(TPST)は、酸性アミノ残基に隣接するチロシンを特異的に認識し及び硫酸化するからである(Bundgaardら、J. Biol. Chem.、272: 21700-05 (1997))。GPIb の酸性領域の完全な硫酸化は、著しい負の電荷密度を伴う領域 - 19個のアミノ酸の短い配列内に13個の負電荷 - を生じ、並びに他の蛋白質との静電的相互作用の候補部位である。

【0023】

硫酸化されたN-末端チロシンは、ヒト及びサル免疫不全ウイルス(HIV-1、HIV-2、及びSIV)の標的細胞への侵入に関連した7回膜貫通セグメント(7TMS)受容体との共-受容体として役目を果たす、CCR5のようなCC-ケモカイン受容体の役割に影響を及ぼすことも考えられる。例えば、硫酸化されたN-末端チロシンは、CCR5のMIP-1、MIP-1、及びHIV-1 gp120/CD4複合体への結合、並びにHIV-1のCCR5及びCD4を発現している細胞へ侵入する能力に寄与すると考えられる。別の重要なHIV-1共-受容体であるCXCR4も、硫酸化される(Farzanら、Cell、96(5): 667-76 (1999))。チロシン硫酸化は、CXCR4-依存型HIV-1侵入においては、CCR5-依存型侵入よりも、役割の重要性が低く；従ってこれは、CXC-ケモカインファミリーにおけるチロシン硫酸化の潜在的役割を明らかにし、並びにCCR5及びCXCR4のHIV-1利用における一般的差異を際立たせている(Farzanら、J. Biol. Chem.、277(33): 29,484-89 (2002))。

10

【0024】

セレクチン及びPSGL-1

P-、E-、及びL-セレクチンは、機能の中でも特に、血管内皮上の白血球のローリングを媒介する接着分子ファミリーのメンバーである。P-セレクチンは、血小板中の顆粒として貯蔵され、及びトロンピン、ヒスタミン、ホルボールエステル、又は他の刺激分子による活性化後に、表面に輸送される。P-セレクチンは、活性化された内皮細胞上でも発現される。E-セレクチンは、内皮細胞上で発現され、並びにL-セレクチンは、好中球、単球、T細胞、及びB細胞上で発現される。

20

【0025】

PSGL-1(CD162とも称される)は、GPIbと構造的類似性を共有しているP-セレクチン、E-セレクチン、及びL-セレクチンのためのムチン糖蛋白質リガンドである(Afshar-Kharghanら(2001)、前掲)。PSGL-1は、PACE(対のある塩基性アミノ酸転換酵素)切断部位を有するジスルフィド-連結したホモ二量体である。PSGL-1は、プロリン、セリン及びトレオニンが豊富である10~16個の十量体反復配列が続く、3個の可能性のあるチロシン硫酸化部位も有する。PSGL-1の細胞外部分は、3個のN-連結されたグリコシル化部位を含み、及び多くのシアリル化、フコシル化されたO-連結されたオリゴ糖分枝を有する(Mooreら、J. Biol. Chem.、118: 445-56 (1992))。ほとんどのN-グリカン部位及び多くのO-グリカン部位は、占拠されている。ヒトHL-60細胞由来のPSGL-1のO-グリカン構造が決定されている。これらのO-グリカンのサブセットは、セレクチンに結合するために必要である、コア-2、シアリル化及びフコシル化された構造である。PSGL-1のアミノ-末端領域のチロシン硫酸化は、P-セレクチン及びL-セレクチンへの結合にも必要である。更に、恐らく翻訳後切断されるN-末端プロペプチドが存在する。

30

【0026】

PSGL-1は、HL60細胞において361残基を有し、267残基の細胞外領域、25残基の膜貫通領域、及び69残基の細胞内領域を伴い、並びに細胞表面上にジスルフィド-結合されたホモ二量体又はヘテロ二量体を形成する(Afshar-Kharghanら、Blood、97: 3306-12 (2001))。PSGL-1をコードしている配列は、1個のエキソン内であり、選択的スプライシングは不可能である。しかし、HL60細胞内の、及びほとんどの細胞株内のPSGL-1は、細胞外領域に存在する10残基のコンセンサス配列の15の連続する反復配列を有するが、多形核白血球、単球、及びほとんど未変性の白血球を含むいくつかの他の細胞株においては、この配列の14及び16の反復配列が存在する。

40

【0027】

PSGL-1は、二量体として好中球上に発現され、見かけの分子量は250kDa及び160kDaの両

50

方であるのに対し、HL60上の二量体型は、約220kDaである。還元条件(reducing condition)下で分析された場合、各サブユニットは半分に減少される。分子量の差は、異なる数の十量体反復配列の存在により引き起こされた分子内の多形が原因であろう(Leukocyte Typing VI., T. Kishimotoら編集、(1997))。

【0028】

ほとんどの血液白血球、例えば好中球、単球、白血球、B細胞サブセット、及び全てのT細胞などは、PSGL-1を発現する(Kishimotoら(1997)、前掲)。PSGL-1は、活性化された内皮上、活性化された血小板上、並びに他の白血球及び炎症部位上の白血球のローリングを媒介し、並びにP-セレクチン上の好中球のローリングを媒介する。PSGL-1は、L-セレクチンとの結合を介し好中球-好中球相互作用も媒介し、これにより炎症を媒介する(Snappら、Blood、91(1): 154-64 (1998))。

10

【0029】

白血球ローリングは、炎症において重要であり、並びにP-セレクチン(活性化された内皮により及び血小板上に発現され、これは損傷部位に固定される)とPSGL-1の間の相互作用は、白血球の血管壁へのつなぎ止め及びローリングの道具である(Ramachandranら、PNAS、98(18): 10166-71 (2001); Afshar-Kharghanら(2001)、前掲)。細胞ローリングは、転移においても重要であり、並びに内皮細胞上のP-及びE-セレクチンは、転移細胞に結合すると考えられ、これにより血流から周辺組織への溢出を促進する。

【0030】

従って、PSGL-1は、全ての白血球：好中球、単球、リンパ球、活性化された末梢T細胞、顆粒球、好酸球、血小板、並びに一部のCD34陽性幹細胞及びある種のB細胞サブセット上において認められる。P-セレクチンは、活性化された血小板及び内皮細胞上で選択的に発現される。P-セレクチンとPSGL-1の間の相互作用は、血管壁上の白血球のローリングを促進し、並びに血管部位での白血球の異常な蓄積は、様々な病原性炎症を生じる。PSGL-1上の個々のチロシン硫酸塩の立体-特異的寄与は、P-セレクチンのPSGL-1への結合にとって重要である。電荷も、結合に重要であり：NaCl減少(150から50mM)は結合を増強した(Kd ~ 75nM)。PSGL-1上のチロシン-硫酸化は、P-セレクチンへのPSGL-1接着を増強するが、最終的にはこれに必要ではない。PSGL-1チロシン硫酸化は、全ての剪断速度で、比較的遅いローリング接着を支援し、並びに非常に高い剪断速度でのローリング接着を支援する(Rodgersら、Biophys. J., 81: 2001-09 (2001))。更に、血小板上のPSGL-1発現は、白血球のその1/25 ~ 1/100であることが示唆されている(Frenetteら、J. Exp. Med., 191(8): 1413-22 (2000))。

20

30

【0031】

ヒトPSGL-1に対する市販のモノクローナル抗体であるKPL1は、PSGL-1とP-セレクチンの間及びPSGL-1とL-セレクチンの間の相互作用を阻害することが示されている。KPL1エピトープは、PSGL-1のチロシン硫酸化領域(YEYLDYD)にマッピングされた(Snappら、Blood、91(1): 154-64 (1998))。

【0032】

シアリル化され、フコシル化されたムチンリガンドを取り除くO-シアログリコプロテアーゼによる腫瘍細胞の前処理も、腫瘍細胞-血小板複合体形成を阻害した。In vivo実験は、これらの処理のいずれかは、循環している腫瘍細胞とのより大きい単球会合を生じることを示しており、これは減少する血小板結合は、循環している腫瘍細胞への免疫細胞による接近を増加していることを示唆している(Varki及びVarki、Braz. J. Biol. Res., 34(6): 711-17 (2001))。

40

【0033】

フィブリノーゲン

正常なヒトフィブリノーゲンのふたつの型 - 正常()及びプライム(prime)があり、その各々は、健常者において認められる。より豊富な型(体内で認められる総フィブリノーゲンの約90%)である正常なフィブリノーゲンは、2個の同一の55kDa鎖、2個の同一の95kDa鎖、及び2個の同一の49.5kDa鎖で構成される。量が少ない型(体内で認められる

50

総フィブリノーゲンの約10%)である正常な変種フィブリノーゲンは、2個の同一の55kDa鎖、2個の同一の95kDa鎖、1個の49.5kDa鎖、及び1個の変種50.5kDaプライム鎖で構成されている。鎖及びプライム鎖は、両方とも同じ遺伝子によりコードされており、3'末端で選択的スプライシングが生じている。正常な鎖は、アミノ酸1-411で構成され、及び正常な変種プライム鎖は、427アミノ酸で構成され、そのアミノ酸1-407は、正常な鎖のものと同じであり、及びアミノ酸408-427はVRPEHPAETEDSLYPEDDLである。この領域は通常トロンビン分子により占拠されている。

【0034】

フィブリノーゲンは、イオン化されたカルシウム存在下、トロンビンの作用によりフィブリンに転換され、血液の凝固を生じる。フィブリンも血栓、及び急性炎症滲出液の成分である。

10

【0035】

目的

本発明の目的は、細胞ローリング、炎症、免疫応答、感染症、自己免疫反応、及び転移などのプロセスの助けとなる、様々な分子上に存在するエピトープに結合するが、接着、血栓及び/又は再狭窄及び凝集などのプロセスには関連しないような、抗体それらの断片又はそれらの複合体を提供することであり、ここでエピトープは、罹患した細胞、例えばAML細胞、T-ALL細胞、Pre-B-ALL細胞、B-白血病、B-CLL細胞、多発性骨髄腫細胞、及び転移細胞などに存在している。

【0036】

本発明の別の目的は、細胞ローリング、炎症、免疫応答、感染症、自己免疫反応、及び転移などを阻害するが、依然接着、血栓及び/又は再狭窄及び凝集などには関係せず、及びAML、T-ALL、B-白血病、B-CLL、Pre-B-ALL、多発性骨髄腫、転移などの疾患、心筋梗塞のような心臓血管疾患、網膜症、硫酸化されたチロシン-依存型蛋白質-蛋白質相互作用により引き起こされた疾患、又はそのような細胞機能もしくは作用が重要な役割を果たす他の疾患の治療のための、医薬品の開発及び供給におけるそのような抗体の使用を含む。

20

【0037】

例えばAML、T-ALL、B-白血病、B-CLL、Pre-B-ALL、多発性骨髄腫、及び転移、又は細胞ローリング、炎症、免疫応答、感染症、自己免疫反応、転移などのそのような細胞機能もしくは作用が重要な役割を果たす他の疾患などの、個人の様々な疾患状態の診断、予後判定、又は病期決定の方法においてこれら抗体を利用することも、本発明の目的である。並びに本発明の別の目的は、腫瘍細胞をパーズする方法を提供する。

30

【0038】

更に別の本発明の目的は、この抗体を投与することにより、ADCCを活性化又はNKもしくはT細胞を刺激する方法を提供する。

【0039】

これら及び他の本発明の目的が、本願明細書に提供される。

【発明の開示】

【0040】

発明の概要

本発明は、配列番号:1のscFv抗体断片の結合能を有する抗体又はそれらの断片を提供する。本発明は、少なくとも1種の抗体、又はそれらの結合断片が、配列番号:2の第一の超可変領域、配列番号:3の第二の超可変領域、及び/又は配列番号:4の第三の超可変領域を有する、抗体又はそれらの断片も提供する。本発明の抗体又はそれらの断片は、好ましくは、PSGL-1のエピトープに結合又は交差反応する。同じく好ましくは、本発明の抗体又はそれらの断片は、T-ALL、AML、B-白血病、B-CLL及び多発性骨髄腫白血球の細胞からなる群より選択される少なくとも1種の細胞型上のエピトープに結合する。

40

【0041】

本発明は、本発明の抗体又はそれらの結合断片に結合するアミノ酸配列を有する単離されたエピトープも提供する。好ましくは、単離されたエピトープは、成熟PSGL-1のアミノ

50

酸1と17の間に位置し、これは負帯電したアミノ酸のクラスター内にある。

【0042】

医薬組成物及びそのような抗体又はそれらの断片を製造するための方法も提供する。細胞ローリングの阻害又は治療；炎症の阻害又は治療；自己免疫疾患の阻害又は治療；感染症(例えば、HIVのようなウイルス感染症)の阻害又は治療；転移の阻害又は治療；腫瘍細胞の増殖及び/又は複製の阻害又は治療；腫瘍細胞の致死率の増加；白血病細胞の増殖及び/又は複製の阻害；白血病細胞の致死率の増加；疾患治療薬による損傷に対する罹患した細胞の感受性の変更；抗癌剤による損傷に対する腫瘍細胞の感受性の増加；抗白血病薬による損傷に対する白血病細胞の感受性の増加；腫瘍を有する患者における腫瘍細胞数の増加の阻害；癌患者における腫瘍細胞数の減少；白血病患者における白血病細胞数の増加の阻害；並びに、白血病患者における白血病細胞数の減少に関連した状態を含む、様々な状態を治療するためのそのような医薬組成物を利用する方法が提供される。他の方法は、本抗体又はそれらの断片を使用し、ADCCを誘導又はNKもしくはT細胞を刺激するために提供される。

10

【0043】

本発明は、患者由来の細胞を含有する試料を提供し、並びに患者由来の細胞を本発明の抗体又はポリペプチドと共にインキュベーションすることにより、患者から腫瘍細胞をパージする方法も提供する。

【0044】

定義

抗体(Ab)、又は免疫グロブリン(Ig)は、抗原に結合する蛋白質分子である。天然の抗体の各機能的結合ユニットは、ジスルフィド結合により共に連結された4個のポリペプチド鎖(2個の重鎖及び2個の軽鎖)ユニットで構成されている。これらの鎖の各々は、定常領域及び可変領域を含む。天然の抗体は、それらの重鎖成分を基に、IgG、IgM、IgA、IgD、及びIgEを含むいくつかのクラスに分けることができる。IgGクラスは、IgG₁、IgG₂、IgG₃、及びIgG₄を含むが、これらに限定されるものではない、いくつかのサブクラスを包含している。免疫グロブリンは、Bリンパ球により*in vivo*において産生されており、並びにそのような分子は、各々、特定の外来抗原決定基を認識し、及びその抗原のクリアリングを促進する。

20

【0045】

抗体は、抗体複合体を含む、多くの形で産生され及び使用することができる。本願明細書において使用される用語「抗体複合体(又は複数)」は、他の抗体と、もしくは抗体断片(又は複数)と、1種又はそれよりも多い抗体の複合体、又は2種もしくはそれよりも多い抗体断片の複合体を意味するように使用される。抗体断片の例は、Fv、Fab、F(ab')₂、Fc、及びFd断片を含む。従って、本願明細書において使用される用語「抗体又はそれらの断片」は、抗体複合体(又は複数)を含む。

30

【0046】

本願明細書及び「特許請求の範囲」において使用されるFvは、同じ又は異なってよく、並びにここで重鎖可変領域は、軽鎖可変領域と接続、連結、融合もしくは共有結合、又は会合されているような、ヒト抗体の重鎖可変領域及びヒト抗体の軽鎖可変領域で作成された分子として定義される。Fvは、単鎖Fv(scFv)又はジスルフィド安定化されたFv(dsFv)であることができる。scFvは、抗体の重鎖及び軽鎖の各々の可変ドメインで構成され、可動性(flexible)アミノ酸ポリペプチドスペーサー、又はリンカーにより連結されている。このリンカーは、分枝されても又はされなくともよい。好ましくはこのリンカーは、0~15個のアミノ酸残基であり、最も好ましくはこのリンカーは、(Gly₄Ser)₃である。

40

【0047】

Fv分子それ自身は、第一鎖及び第二鎖により構成され、各鎖は、第一、第二及び第三の超可変領域を有する。軽鎖及び重鎖の可変ドメイン内の超可変ループは、相補性決定領域(CDR)と称される。重鎖及び軽鎖の各々の中には、CDR1、CDR2、及びCDR3領域が存在する。これらの領域は、抗原結合部位を形成し、及び増強された結合活性を得るために特異的

50

に修飾することができると考えられている。これらの領域で最大の可変性であるのは、事実上重鎖のCDR3領域である。CDR3領域は、Ig分子の最も露出した領域であり、本願明細書に示され提供されたように、観察された選択的及び/又は特異的結合特性を主に担う部位であると理解されている。

【0048】

Fv分子の断片は、当初のFvの選択的及び/又は特異的結合特性を依然保持している、当初のFvよりもより小さい分子として定義される。このような断片の例は、(1)Fvの重鎖のみの断片を含む、ミニボディ、(2)抗体重鎖可変領域の小さい部分ユニット(fractional unit)を含む、マイクロボディ(国際出願PCT/IL99/00581号)、(3)軽鎖の断片を有する類似のボディ、及び(4)軽鎖可変領域の機能性ユニットを有する、類似のボディを含むが、これらに限定されるものではない。Fv分子の断片は、実質的に環状又はループ形成したポリペプチドであることは理解されるべきである。

10

【0049】

本願明細書において使用される用語「Fab断片」は、免疫グロブリンの一価の抗原-結合断片である。Fab断片は、軽鎖及び重鎖の一部により形成される。

【0050】

F(ab')₂断片は、ペプシン消化により得られた免疫グロブリンの二価の抗原結合断片である。これは、両方の軽鎖及び両方の重鎖の一部を含む。

【0051】

Fc断片は、免疫グロブリンの抗原-非結合部分である。これは、重鎖のカルボキシ-末端部分及びFc受容体の結合部位を含む。

20

【0052】

Fd断片は、免疫グロブリンの重鎖の可変領域及び第一の定常領域である。

【0053】

ポリクローナル抗体は、免疫応答の産物であり、多くの異なるBリンパ球により形成される。モノクローナル抗体は、ひとつのクローン性B細胞に由来している。

【0054】

ポリペプチドに適用され及び本発明において定義されるカセットとは、フレームワークとして役立ち、並びに単独のユニットとしてみなされ及びそのように操作される、連続したアミノ酸の所定の配列を意味する。アミノ酸は、一方又は両方の末端で、置換、挿入、除去、又は結合することができる。同様にアミノ酸の短い配列は、一方又は両方の末端で、置換、挿入、除去、又は結合することができる。

30

【0055】

用語「エピトープ」は、本願明細書において、抗原決定基もしくは認識部位、又は抗体、抗体断片、抗体複合体もしくはそれらの結合断片を有する複合体もしくはT細胞受容体と相互作用する抗原部位を意味するように使用される。用語エピトープは本願明細書において、用語リガンド、ドメイン、及び結合領域と互換的に使用される。

【0056】

選択性は、本願明細書において、標的化分子の、実体又は実体状態の混合物由来のひとつの実体又は細胞状態を選択及び結合する能力と定義され、この全ての実体又は実体状態は、標的分子に特異的である。

40

【0057】

本願明細書において使用される用語「親和性」は、結合分子(例えば、抗体上のひとつの結合部位)とリガンド(例えば、抗原決定基)の間の結合強度(会合定数)の測定値である。抗体上の単独の抗原-結合部位と単独のエピトープの間の非共有的相互作用の総計の強度は、そのエピトープに関する抗体の親和性である。低親和性抗体は、抗原に弱く結合し、及び容易に解離する傾向があるのに対し、高-親和性抗体は、抗原により密に結合し、及びより長く結合し続ける。用語「アビディティ」は、親和性とは異なり、その理由は、前者は抗原-抗体相互作用の結合価を反映しているからである。

【0058】

50

抗体-抗原相互作用の特異性：抗原-抗体反応は特異的であるが、場合によっては、ひとつの抗原により誘起された抗体は、別の無関係の抗原と交差反応することができる。このような交差反応は、ふたつの異なる抗原が、相同又は類似の構造、エピトープ、もしくはそれらのアンカー領域を共有する場合、又は1個のエピトープに特異的な抗体が、同様の構造的コンホメーション又は化学特性を有する無関係のエピトープに結合する場合に生じる。

【0059】

血小板は、骨髓類洞を流れる巨核球の円板-様の細胞質断片であり、引き続き末梢血流内を循環する。血小板は、凝固における重要な役割を含む、いくつかの生理的機能を有する。血小板は、中心に位置した顆粒及び周辺の透明な原形質を含むが、境界のある核は有さない。

10

【0060】

本願明細書において使用される凝集反応は、浮遊された細菌、細胞、円板(disc)、又は同様のサイズの他の粒子が、接着を引き起こし、集塊を形成するプロセスを意味する。このプロセスは、沈降に類似しているが、これらの粒子はより大きく、及び溶液中に存在するよりもむしろ懸濁している。

【0061】

用語凝集は、血栓又は止血栓子の形成につながる連続機構の一部として、*in vitro*において誘導された血小板、並びにトロンビン及びコラーゲンの集塊化を意味する。

【0062】

保存的アミノ酸置換は、ペプチド、ポリペプチドもしくは蛋白質、又はそれらの断片の1個又は2個のアミノ酸の変更による、アミノ酸組成の変化として定義される。この置換は、一般に類似した特性(例えば、酸性、塩基性、芳香性、サイズ、正又は負帯電、極性、非-極性)を伴うアミノ酸のものであり、その結果これらの置換は、実質的にペプチド、ポリペプチド又は蛋白質の特性(例えば、電荷、等電点、親和性、アビディティ、コンホメーション、溶解度)又は活性を変更しない。このような保存的アミノ酸置換について行うことができる典型的置換は、下記のアミノ酸群間であることができる：

20

グリシン(G)、アラニン(A)、バリン(V)、ロイシン(L)及びイソロイシン(I)

アスパラギン酸(D)及びグルタミン酸(E)

アラニン(A)、セリン(S)及びトレオニン(T)

30

ヒスチジン(H)、リシン(K)及びアルギニン(R)

アスパラギン(N)及びグルタミン(Q)

フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)及びトリプトファン(W)。

【0063】

保存的アミノ酸置換は、例えば、その分子の選択的及び/又は特異的結合特性を主に担っている超可変領域に隣接する領域に加え、その分子の他の部分、例えば可変重鎖カセットなどに行うことができる。加えて又は代わりに、これらの分子を再構成し、完全サイズの抗体、二重特異性抗体(二量体)、三重特異性抗体(三量体)、及び/もしくは四重特異性抗体(四量体)を形成するため、又はミニボディもしくはマイクロボディを形成するために、修飾を行うことができる。

40

【0064】

ファージミドは、プラスミドDNAを運搬するファージ粒子として定義される。ファージミドは、fdのm13のような、繊維状ファージ由来の複製起点を含むようにデザインされたプラスミドベクターである。これはプラスミドDNAを運搬するので、このファージミド粒子は、ファージゲノムの完全な相補体を含むのに十分な空間を有さない。ファージゲノムから失われている成分は、ファージ粒子のパッケージングに必須の情報である。従ってファージを増殖するために、所望のファージ粒子を、失われたパッケージング情報を補うヘルパーファージ株と共に培養することが必要である。

【0065】

プロモーターは、RNAポリメラーゼが結合し及び転写を開始するDNAの領域である。

50

【0066】

ファージディスプレイライブラリー(ファージペプチド/抗体ライブラリー、ファージライブラリー、又はペプチド/抗体ライブラリーとも称される)は、多集団のファージ(10⁸又はより多い)を含み、各ファージ粒子は、異なるペプチド又はポリペプチド配列を展示している。これらのペプチド又はポリペプチド断片は、長さが変動するように構築することができる。展示されたペプチド又はポリペプチドは、ヒト抗体重鎖又は軽鎖に由来することができるが、これらに限定されるものではない。

【0067】

医薬組成物は、本発明の抗体又はペプチド又はポリペプチド及び医薬として許容できる担体、賦形剤もしくはそれらの希釈剤、又は抗体-医薬品(抗体-物質)複合体及び医薬として許容できる担体、賦形剤もしくはそれらの希釈剤を含有する製剤を意味する。 10

【0068】

物質は、ヒト、ウシ、ウマ、ブタ、マウス、イヌ、ネコ、又はいずれか他の恒温動物を含むが、これらに限定されるものではない、哺乳類の活動性疾患の治療、予防的治療、又は診断において有用である物質を意味する。この物質は、放射性同位元素、毒素、医薬品、オリゴヌクレオチド、組換え蛋白質、抗体断片、抗癌剤、抗接着薬、抗血栓薬、抗再狭窄薬、自己免疫疾患治療薬、抗凝集薬、抗菌剤、抗ウイルス薬、及び抗炎症薬の群より選択される。このような物質の他の例は、アシクロビル、ガンシクロビル、及びジドブジンを含む、抗ウイルス薬；シロスタゾール、ダルテパリンナトリウム、レビパリンナトリウム、及びアスピリンを含む、抗血栓/再狭窄薬；ザルトプロフェン、プラノプロフェン、ドロキシカム、アセチルサリチル酸17、ジクロフェナック、イブuproフェン、デキシブuproフェン(dexibuprofen)、スリンダック、ナプロキセン、アムトルメチン(amtolmetin)、セレコキシブ、インドメタシン、ロフェコキシブ、及びニメスリドを含む、抗炎症薬；レフルノミド、デニロイキンジフチトックス(denileukin diftitox)、スブレウム(subreum)、WinRho SDF、デフィブロチド(defibrotide)、及びシクロホスファミドを含む、自己免疫疾患治療薬；並びに、リンプロスト(limaprost)、クロルクロメン(clorcromene)及びヒアルロン酸を含む、抗接着/抗凝集薬を含むが、これらに限定されるものではない。 20

【0069】

抗白血病薬は、抗白血病活性を伴う物質である。例えば、抗白血病薬は、白血病細胞又は未熟なプレ-白血病細胞の増殖を阻害又は停止する物質、白血病細胞又はプレ-白血病細胞を殺傷する物質、白血病細胞又はプレ-白血病細胞の他の抗白血病薬に対する感受性を増加する物質、並びに白血病細胞の転移を阻害する物質を含む。本発明において、抗白血病薬は、腫瘍の血管新生を妨害、阻害、遅延又は停止する抗-血管形成活性を伴う物質であってよい。 30

【0070】

遺伝子の発現パターンは、様々な組織において、特定の時間で、様々な条件下などで作成された遺伝子産物の量を分析することにより研究することができる。遺伝子は、遺伝子産物の量が、正常対照、例えば罹患していない対照において認められるものよりも高い場合、「過剰発現された」とみなされる。

【0071】

所定の細胞は、その表面上に、所定の抗体に関する結合部位(又はエピトープ)を有する蛋白質を発現することができるが、その結合部位は、ある状態で(in a state)細胞中に潜在型(例えば、立体的に妨害されたもしくはブロックされた、又は抗体による結合に必要な特徴を欠いている)で存在することができる、これは第一ステージ(ステージI)と称することができる。ステージIは、例えば正常で、健全な、罹患していない状態であってよい。エピトープが潜在型で存在する場合、これは所定の抗体によっては認識されず、すなわち、ステージIで、このエピトープ又は所定の細胞に対する抗体の結合はない。しかしエピトープは、例えばそれ自身修飾を受けるか、又はブロックが解かれることにより露出され、その理由は、近隣又は会合した分子が修飾されるため、又は領域がコンホメーションの変化を受けるためである。修飾の例は、折畳みの変化、翻訳後修飾の変化、リン脂質化の 40 50

変化、硫酸化の変化、グリコシル化の変化などがある。このような修飾は、細胞が、第二ステージ(ステージII)と称される異なる状態に進む場合に生じることがある。1種又は複数の第二の状態の例は、活性化、増殖、形質転換、又は悪性状態を含む。修飾時に、エピトープは露出され、及び抗体が結合することができる。

【0072】

ペプチド-ミメティック(ペプチド-ミメティック)は、アミノ酸の間に最早ペプチド結合、すなわちアミド結合を含まない分子(例えば抗体)である；しかし、本発明の状況において、用語ペプチド-ミメティックは、例えば偽-ペプチド、半-ペプチド及びペプトイドのような、事実上最早完全にペプチド性でない分子を含むことが意図されている。本発明の完全な又は部分的な非-ペプチド、ペプチド-ミメティックは、ペプチド-ミメティックの基となったペプチド内の活性基の三次元配置を密に似ている反応性化学的部分の空間的配置を提供する。これらの分子は、小分子、脂質、多糖又はそれらの複合体を含む。

10

【0073】

発明の詳細な説明

本発明は、PSGL-1に結合する配列番号:1のscFv抗体断片の結合能を有する抗体又はそれらの断片に関する。従って、本発明のこれらの抗体は、配列番号:1と同様の結合親和性を有する。配列番号:1のscFv断片は、L32と称される。従って好ましくは、本発明の抗体はL32である。この抗体は、白血病細胞表面決定基を認識する特異的抗体を選択するために白血病細胞に対する重鎖CDR3領域においてのみ多様性を有する、ファージライブラリーのスクリーニングにより同定され、ここでこの特異的受容体は、これまでは知られても特徴決定もされていない。この同じ方法を用い、別の抗体L31を同定した。本発明は、多くの抗体を包含しているが、以後L32が例として使用されるであろう。

20

【0074】

先に、白血病細胞に結合する他の抗体が、米国特許出願第10/032,423号；第10/032,037号；第10/029,988号；第10/029,926号；第09/751,181号；及び、第60/258,948号、並びに国際出願PCT/US01/49442号及びPCT/US01/49440号において、同じファージライブラリーを使用し定義されている。これらの出願において開示された抗体の具体例は、Y1及びY17抗体を含む。これらの出願において開示された抗体は、造血細胞の蛋白質上に認められたエピトープに特異的に結合することが発見されており、これはN-末端チロシンで硫酸化され、及び細胞移動、例えば腫瘍転移に関連していると考えられる。

30

【0075】

L32抗体及び前記出願において開示されたY1/Y17抗体は両方とも、白血病細胞に結合するが、L32は、Y1よりも約5倍大きい親和性で白血病細胞に結合する。この事実に加え、これらの抗体は共通の生殖細胞系(DP32)から単離されたという事実を基に、比較試験を行い、それらの各々の結合エピトープ間の相関関係を決定した。次に、L32は、Y1/Y17と同じ硫酸化されたエピトープに結合するよう見えることを決定した。Y1/Y17エピトープは血小板上に特異的に存在するので、発現レベルは、白血球のそれよりも1/25~1/100低いことが示唆され(Frenetteら、J. Exp. Med.、191(8): 1413-22 (2000))、L32の血小板への結合も評価されている。しかしL32は、無視できるように血小板に結合するのみであり、更に血小板凝集には影響を及ぼさないことが分かった。表1において、L32のscFv及びIgGと比べた、Y1のscFv及びIgGのまとめを示している。

40

【0076】

【表1】

表1.

	Y1 scFv	Y1 IgG	L32 scFv	L32 IgG
WBC結合	低	高	高	非常に高
白血病細胞結合	低	高	高	非常に高
PSGL-1反応性	低	高	高	非常に高
KPL1との競合	若干	あり	あり	あり
血小板結合	高	高	低-なし	低-なし
血小板凝集	阻害	誘導	作用せず	—
GPIb反応性	結合	結合	非常に低い-なし	非常に低い-なし
血漿成分	フィブリノー ゲン プライム CCF4	フィブリノー ゲン プライム CCF4	検出されず	非常に低い-なし
In vitro作用	検出されず	ADCC	検出されず	ADCC

10

20

【0077】

Y1/Y17に結合するとして先に同定されている硫酸化されたエピトープは、好ましくは2個又はそれよりも多い酸性アミノ酸のクラスター内で、硫酸化されたチロシン残基又は硫酸化された糖質もしくは脂質部分のような、硫酸化された部分の存在により特徴付けられ、これは、炎症、免疫応答、感染症、自己免疫反応、転移、接着、血栓及び/又は再狭窄、細胞ローリング、並びに凝集などのような多様なプロセスにおいて重要な役割を果たすリガンド及び受容体上に見つけられている。このようなエピトープは、罹患した細胞、例えばB-白血病細胞、B-CLL細胞、AML細胞、多発性骨髄腫細胞、及び転移細胞上でも見つかっている。これらのエピトープは、これらのプロセスの治療的媒介のための、及び病期決定を含む診断又は予後判定手法のための有用な標的である。

30

【0078】

L32 scFvは、硫酸化されたPSGL-1に対する増大された選択性を有する。単球、好中球、及びリンパ球のような炎症に関連した白血球(white cell)は、アテローム性動脈硬化症のような疾患の炎症プロセスにおいてPSGL-1、P-セレクトリン、VLA-4、及びVCAM-1の4種の接着分子により主に動員される(Huo及びLey、Acta Physiol. Scand.、173: 35-43 (2001); Libby、Sci. Am.、May: 48-55 (2002); Wangら、J. Am. Coll. Cardiol.、38: 577-582 (2001))。これらの中心分子のいずれかとのL32干渉は、関連疾患の排除におけるL32の潜在的役割を示唆している。詳細に述べると、P-セレクトリンは、細胞付着及びローリングを制御する。加えて、P-セレクトリン-PSGL-1相互作用は、腫瘍発生(悪性細胞に関して)及び炎症反応(白血球に関して)に総合的に結びついている細胞上の多くの他の分子を活性化する(Shebuski及びKilgore、J. Pharmacol. Exp. Ther.、300: 729-735 (2002))。このP-セレクトリンの細胞プロセスを調節する能力に関する理解を基に、硫酸化されたPSGL-1に対する増強されたL32 scFv選択性は、これを、様々な悪性及び炎症性疾患の治療のための優れた分子にし得ることは明らかである。更に悪性疾患のモデルは、悪性細胞へのP-セレクトリン結合は、PSGL-1の硫酸化を必要とすることを示している(Ma及びGeng、J. Immunol.、168: 1690-1696 (2002))。この必要要件は、L32結合のものと似ている。従って、L32は、悪性疾患の進行のP-セレクトリン促進を排除することが予想され得る。

40

【0079】

更に、本発明のこれらの抗体に関して、結合は、細胞の発達段階に左右されることがわ

50

かった(AML亜型は、通常の処理及び細胞化学染色下で観察された形態学を用い、FAB(仏-米-英)システムを基に分類される):これらの抗体は、亜型M3又はそれを超える細胞であるAML細胞には結合するが、M0又はM1亜型細胞には結合しない。加えてこれらの抗体は、M2亜型細胞に結合してもしなくてもよい。従って本発明の抗体は、正常で、健全な骨髄(例えば、CD34+細胞)には結合しない。このような差異は、PSGL-1発現及び/又は硫酸化における変更、更にはわずかに異なるエピトープに曝されるPSGL-1における可能性のあるコンホメーション変化を基にしている。

【0080】

好ましくは、本発明のL32抗体は、PSGL-1のような、炎症に関連した様々な分子又はエピトープに結合する。同じく好ましくは、L32抗体は、T-ALL細胞、AML細胞、及びB-白血病細胞を含む、炎症又は腫瘍発生に関連した少なくとも1種の細胞型上に存在するエピトープに結合する。更に好ましくは、本発明のL32抗体は、脂質、糖質、ペプチド、糖脂質、糖蛋白質、リポ蛋白質、及び/又はリポ多糖分子上のエピトープに結合する。このようなエピトープは、好ましくは、少なくとも1個の硫酸化された部分を有する。あるいは、しかし更に好ましくは、L32抗体は、2種又はそれよりも多いエピトープと交差反応し、各エピトープは、1個又はそれよりも多い硫酸化されたチロシン残基、及び2個又はそれよりも多い酸性アミノ酸の少なくとも1種のクラスターを有し、その例はPSGL-1である。

10

【0081】

本発明のこれらの抗体又はそれらの断片は、細胞表面上に存在するPSGL-1への結合後、その細胞へと内部移行される。一般に、完全IgG抗体は内部移行されるが、より小さい抗体断片(例えばscFv)は内部移行されない。これらの抗体は、例えばAML細胞を含む、PSGL-1を発現しているいずれかの細胞へ内部移行され得ることは理解されるべきである。このような内部移行は、方式、時間及び温度に依存する活性プロセスであるエンドサイトーシスを介して起こり得る。

20

【0082】

抗原結合部位の形成に参画するのは、本発明のL32抗体の超可変領域である。この抗原-結合部位は、抗体が結合するエピトープの構造に相補的であり、従ってこれらの結合部位は、相補性決定領域(CDR)と称される。抗体の軽鎖及び重鎖の各々には3種のCDRが存在し(CDR1、CDR2、及びCDR3)、各々V_H及びV_Lドメインの鎖に接続するループ上に位置する。これらの領域の最も可変性のものは、重鎖CDR3領域である。このCDR3領域は、Ig分子の最も露出した領域と理解され、本願明細書において提供されるように、観察された選択的及び/又は特異的結合特性の決定において中心的役割を有する。

30

【0083】

ファージディスプレイライブラリーに存在する49種の生殖細胞系のひとつであるDP32は、それから本発明のscFv抗体が単離されたファージライブラリーの特異的生殖細胞系である。従ってDP32は、少なくとも重鎖及び軽鎖フレームワーク可変領域、軽鎖CDR1、CDR2、及びCDR3領域、並びに/又は重鎖CDR1及びCDR2を伴う本発明の抗体を提供する。DP32は、超可変領域が構成される3次元構造も提供する。抗体の特異性は、その3次元コンホメーションにより決定されることは周知である。従ってDP32により強いられた制限は、L32抗体の特異性の決定において、重大な役割を有することがある。更にDP32は、様々な帯電したアミノ酸を有し、これはL32抗体認識において構造的役割を果たすことができる。

40

【0084】

本発明に従い、CDRは、カセットに挿入され、抗体を作成することができる。ポリペプチドに適用され及び本発明において定義されたようなカセットは、フレームワークとして役立ち並びに単独のユニットと見なされ及びそのように操作される連続したアミノ酸の所定の配列を意味する。アミノ酸は、一方又は両方の末端で、置換、挿入、除去、又は結合することができる。同様にアミノ酸のひとつの配列は、一方又は両方の末端で、置換、挿入、除去、又は結合することができる。

【0085】

このカセットのアミノ酸配列は、目立つように固定されるのに対し、置換、挿入又は結

50

合された配列は、高度に変化することができる。このカセットは、いくつかのドメインで構成され、その各々は最終構築体にとって重要な機能を包含している。

【0086】

本発明の特定の態様のカセットは、N-末端から、フレームワーク領域1(FR1)、CDR1、フレームワーク領域2(FR2)、CDR2、フレームワーク領域3(FR3)、及びフレームワーク領域4(FR4)を含む。

【0087】

本発明のある態様において、カセット内の個別の領域を置換することが可能である。例えば、カセットのCDR2及びCDR1超可変領域は、非保存的、又は好ましくは保存的アミノ酸置換により、置換又は修飾することができる。

10

【0088】

本発明の好ましい態様において、抗体又はそれらの断片は、重鎖及び軽鎖を有し、並びに各鎖は、第一、第二、及び第三の超可変領域を有し、これは各々、CDR3、CDR2、及びCDR1領域である。特に、1本鎖のCDR3領域、軽鎖のCDR3領域、又は好ましくは重鎖のCDR3領域のいずれか、より好ましくは重鎖及び軽鎖の両方のCDR3領域は、結合の選択性及び特異性を決定する。従属的にこの結合の選択性及び特異性は、軽鎖の、及び好ましくは重鎖のCDR2及びCDR1領域により決定される。第一、第二及び/又は第三の超可変領域にフランキングする上流又は下流の領域は、二次的に結合の選択性及び特異的に影響を及ぼし得る。

【0089】

本発明のひとつの好ましい態様において、少なくとも1種の抗体又はそれらの断片は、配列番号:2の第一の超可変領域(CDR3)を有する。加えて又は代わりに、少なくとも1種の抗体又はそれらの断片は、配列番号:3の第二の超可変領域(CDR2)を有する。同じく加えて、又は代わりに、少なくとも1種の抗体又は(pr)それらの断片は、配列番号:4の第三の超可変領域(CDR1)を有する。より好ましくは、少なくとも1種の抗体又はそれらの断片は、配列番号:2の第一の超可変領域(CDR3)及び配列番号:3の第二の超可変領域(CDR2)及び配列番号:4の第三の超可変領域(CDR1)を有する。

20

【0090】

特に好ましい態様において、少なくとも1種の抗体、又はこの抗体もしくはそれらの断片の、それらの結合断片は、配列番号:1を有するscFvである。

【0091】

本願明細書において説明及び詳述されたアミノ酸残基が25個以下であるアミノ酸配列(例えば、CDR領域、CDRフランキング領域)の全てについて、本発明の更なる態様として、これらのアミノ酸配列は、それらの範囲内に、1又は2個のアミノ酸置換(複数)を含むこと、及び好ましくはこの置換は、保存的アミノ酸置換であることが理解され及び考慮される。本願明細書において説明され及び詳述されたアミノ酸残基が25個よりも多い全てのアミノ酸配列について、本発明の態様のように、これらのアミノ酸配列は、それらの範囲内に、当初の配列と90%以上の配列類似性を有するアミノ酸配列を含むことが理解され及び考慮される(Altschulら、Nucleic Acids Res., 25: 3389-402 (1997))。類似又は相同のアミノ酸は、酸性、塩基性、芳香族性、サイズ、正又は負帯電、極性、非極性など、同様の特性を提示する同一でないアミノ酸として定義される。

30

40

【0092】

アミノ酸類似性もしくは相同性又は配列類似性の割合(%)は、2種の異なるペプチド又はポリペプチドのアミノ酸配列の比較により決定される。抗体の配列は、DNA配列決定により決定される。通常その目的のためにデザインされた様々なコンピュータプログラムのひとつを用い、ふたつの配列が並置され、各位置でのアミノ酸残基が比較される。その後アミノ酸の同一性又は類似性が決定される。次にアルゴリズムが適用され、アミノ酸類似性の割合(%)が決定される。ペプチド、ポリペプチド又は蛋白質の分子間のわずかな関係を検出するために感度が大きく増大されるので、アミノ酸配列を比較することが一般に好ましい。蛋白質比較を行い、保存的アミノ酸置換の存在を説明することができ、これにより同一でないアミノ酸が類似した物理的及び/又は化学的特性を有する場合には、ミスマ

50

ッチは依然陽性スコアを生じ得る (Altschulら (1997)、前掲)。

【0093】

本発明の態様において、軽鎖及び重鎖の各々の3種の超可変領域は、ふたつの鎖間で、並びに鎖内及び/又は鎖間の3種の超可変部位の内でも相互交換され得る。更に、超可変領域の配列は、2種又はそれよりも多いCDRを橋渡し (span) するように変更することができる。フレームワーク内の可変領域も同様であり - その結果これも、部分的に *in vivo* CDRであってよい。

【0094】

本発明は、抗体又はそれらの抗原結合断片、それらの構築体、又は断片の構築体を有するペプチド又はポリペプチドを提供する。本発明に従い、抗体は、IgG、IgA、IgD、IgE、又はIgM抗体を含む。IgGクラスは、IgG₁、IgG₂、IgG₃、及びIgG₄を含む、いくつかのサブクラスを含む。

10

【0095】

抗体は、断片、複合体、及び多量体などの多くの形で提供することができる。本発明に従い、抗体断片は、Fv、scFv、dsFv、Fab、Fab₂、及びFd分子を含む。例えばFvsの断片及びFabの断片などのより小さい抗体断片も、それらが、当初の抗体又は比較的大きい断片の結合特性を維持する限りは、用語「断片」に含まれる。構築体は、例えば、二重特異性抗体、三重特異性抗体、及び四重特異性抗体のような多量体を含む。語句「抗体、それらの結合断片、又は抗体もしくはそれらの結合断片を有する複合体」並びに「抗体又は断片」は、これらの分子の全てに加え、本文及び/又は当該技術分野の知識を基に特に別所で特定化又は別所記載されない限りは、それらの誘導體、組合せ、修飾体、ホモログ、ミメティック及び変種を包含することが意図されている。

20

【0096】

scFvは、組織に浸潤し、及びそれらのより小さいサイズのために、完全なサイズの抗体よりもより迅速に血液からクリアランスされることは確立されている (Adamsら、Br. J. Cancer, 77: 1405-12 (1988); Hudson, Curr. Opin. Immunol., 11(5): 548-557 (1999); Wuら、Tumor Targeting, 4: 47 (1999))。従ってscFvは、体から放射性標識物をより迅速にクリアランスさせるために、腫瘍造影のような放射性標識物が関連した診断において使用されることが多い。多くの癌標的化するscFv多量体が、最近 *in vivo* 安定性及び効力について前-臨床試験中である (Adamsら (1988)、前掲; Wu (1999)、前掲)。

30

【0097】

典型的には、scFvモノマーは、V_LのN-末端残基へポリペプチドリinkerによりつなぎ止められたV_HドメインのC-末端を伴う様にデザインされている。任意に、逆方向が使用される: V_LドメインのC-末端は、V_HドメインのN-末端残基にポリペプチドリinkerによりつなぎ止められる (Powerら、J. Immun. Meth., 242: 193-204 (2000))。このポリペプチドリinkerは、典型的には約15個のアミノ酸長である。このリinkerが約3~7個のアミノ酸に減る場合、scFvは、機能性Fvドメインに折り畳まれることができず、代わりに第二のscFvと会合し、二重特異性抗体を形成する。更に3個未満のアミノ酸へリinker長を減少することは、リinker長、組成及びFvドメイン方向に応じ、三量体又は四量体へのscFv会合を強制する (Powers (2000)、前掲)。

40

【0098】

最近、scFv二量体、三量体、及び四量体のような多価抗体断片は、親抗体の標的への結合に勝るより高い親和性を提供することが多いことが発見されている。このより高い親和性は、腫瘍標的化適用に関する改善された薬物動態を含む、可能性のある利点をもたらす。加えて、白血球のつなぎ止め及びローリングに関連している、P-セレクチン及びそのリガンドPSGL-1の研究において、科学者らは、PSGL-1の二量体型を発現している細胞は、より高い結合親和性のために、より安定したローリング接着を確立すると結論付けた。これらの接着は、より剪断抵抗性であり、及びローリング速度においてより少ない変動 (fluctuation) を示した (Ramachandranら、PNAS, 98(18): 10166-71 (2001))。

【0099】

50

scFvの多価型は、他の者によってデザインされ及び作成されている。ひとつの方法は、リンカーによりふたつのscFvsを連結している。別の方法は、連結のために、2個のscFv間のジスルフィド結合を用いることに関する。二量体又は三量体Fvを作成する最も簡単な方法は、Holligerらの論文(PNAS、90: 6444-48 (1993))及びKorttらの論文(Protein Eng.、10: 423-33 (1997))に報告されている。このような方法のひとつは、FOS及びJUN蛋白質領域の配列を追加することにより二量体を作成し、scFvのc-末端で、それらの間にロイシンジッパーを形成するようにデザインされている(Kostelnyら、J. Immunol.、148(5): 1547-53 (1992); De Kruifら、J. Biol Chem.、271(13): 7630-34 (1996))。別の方法は、scFvのc-末端にストレプトアビジンコード配列を追加することにより、四量体を作成するようにデザインされている。ストレプトアビジンは、4個のサブユニットで構成され、そのためこのscFv-ストレプトアビジンが折り畳まれる場合、4個のサブユニットはそれら自身を収容し(accomodate)、四量体を形成する(Kipriyanovら、Hum Antibodies Hybridomas、6(3): 93-101 (1995))。更に別の方法において、二量体、三量体、及び四量体を作成するために、遊離のシステインが、関心のある蛋白質に導入される。可変数(2~4)のマレイミド基を伴うペプチド-ベースの架橋剤を用い、関心のある蛋白質を遊離のシステインに架橋した(Cochranら、Immunity、12(3): 241-50 (2000))。

10

【0100】

これらの多価型より大きい結合親和性は、診断、予後判定、病期決定、及び治療的様式において有益であることができる。例えばscFvは、標的受容体に結合するブロック剤として使用することができ、その結果「天然の」リガンドの結合をブロックする。このような場合、scFvと受容体の間でより高い親和性会合を有し、解離の機会を減少することが望ましく、このことは天然のリガンドの標的への望ましくない結合を可能にすることができ

20

【0101】

このシステムにおいて、ファージライブラリー(本願明細書において先に説明した)は、scFvをディスプレイするようにデザインされ、これは抗体のFv領域の一価の型へと折り畳むことができる。更に及び同じく本願明細書において先に説明したように、この構築体は、細菌発現に適している。遺伝子操作されたscFvは、連続してコードされた15個のアミノ酸の可動性ペプチドスペーサーにより連結された重鎖及び軽鎖可変領域を含む。好ましいスペーサーは(Gly₄Ser)₃である。このスペーサーの長さは、そのアミノ酸、構築体と共に、嵩高でないスペーサーを提供し、これはV_H及びV_L領域を、その標的への効果的結合を提供する機能的Fvドメインへと折り畳ませる。

30

【0102】

これらのスペーサーの長さの変動は、二量体、三量体、及び四量体(triomer)(当該技術分野において、各々、二重特異性抗体、三重特異性抗体、及び四重特異性抗体と称されることが多い)を形成する更に別の好ましい方法である。二量体は、scFvのふたつの可変鎖を連結するスペーサーが一般に5~12個のアミノ酸残基に短縮されるような条件下で形成される。この短縮されたスペーサーは、同じ分子由来のふたつの可変鎖が、機能的Fvドメインへと折り畳まれることを妨害する。代わりに、これらのドメインは、別の分子の相補的ドメインと対形成し、ふたつの結合ドメインを作成するようにしむけられる。好ましい方法において、わずかに5個のアミノ酸(Gly₄Ser)のスペーサーが、二重特異性抗体構築のために使用される。この二量体は、ふたつの同一のscFvから、又はふたつの異なるscFv集団から形成することができ、並びに親scFv(複数)の選択的及び/もしくは特異的に増強された結合活性を維持し、並びに/又は増大した結合強度又は親和性を示す。

40

【0103】

同様の様式で、三重特異性抗体は、scFvのふたつの可変鎖を連結しているスペーサーが、一般に5個未満のアミノ酸残基に短縮されるような条件下で形成され、同じ分子由来のふたつの可変鎖が、機能的Fvドメインへと折り畳まれることを妨害する。代わりに、3個

50

の個別のscFv分子が会合し、三量体を形成する。好ましい方法において、三重特異性抗体は、この可動性スペーサーを完全に除去することにより得られた。三重特異性抗体は、3個の同一scFvから、又は2もしくは3個の異なるscFv集団から形成することができ、並びに親scFv(複数)の選択的及び/もしくは特異的に増強された結合活性を維持し、並びに/又は増大した結合強度又は親和性を示す。

【0104】

四重特異性抗体は、scFvのふたつの可変鎖を連結しているスペーサーが、一般に5個未満のアミノ酸残基に短縮されるような条件下で形成され、同じ分子由来のふたつの可変鎖が、機能的Fvドメインへと折り畳まれることを妨害する。代わりに、4個の個別のscFv分子は会合し、四量体を形成する。四重特異性抗体は、4個の同一scFvから、又は1~4個の異なるscFv集団の個別の単位から形成することができ、並びに親scFv(複数)の選択的及び/もしくは特異的に増強された結合活性を維持し、並びに/又は増大した結合強度もしくは親和性を示す。スペーサーが一般に5個未満のアミノ酸残基長であるような条件下で、三重特異性抗体又は四重特異性抗体のいずれが形成されるかは、混合物中の特定のscFv(複数)のアミノ酸配列及び及び反応条件により左右される。

10

【0105】

一旦望ましい結合能を有する抗体、断片、又は構築体が、選択され及び/又は開発されたならば、当初の抗体の特性を維持する構築体及び断片を作成するために本願明細書に提供された指針を使用することは、十分当業者の能力の範囲内である。例えば、最初に選択されるか又は開発された抗体、断片、又は構築体の望ましい特徴を維持している完全抗体分子、Fv断片、Fab断片、Fab₂断片、二量体、三量体、及び他の構築体を作成することができる。

20

【0106】

アミノ酸を置換するが、依然抗体又は断片の特性を維持していることが望ましい場合は、保存的アミノ酸置換を作成することは十分当該技術分野の技術の範囲内である。様々な物質への複合のような修飾も、それらの結合特性を変更することなく、抗体又は断片を作成することができる。より安定した抗体又は断片を作成するために行われたものなどのその他の修飾も、それらの特異性を変更することなく抗体又は断片を作成することができる。例えば、ペプトイド修飾、セミペプトイド修飾、環状ペプチド修飾、N末端修飾、C末端修飾、ペプチド結合修飾、骨格修飾、及び残基修飾を行うことができる。修飾された抗体又は断片を、それらの結合特性が変更されたかどうかを評価するために試験することも、本願明細書の指針に従い当業者の能力の範囲内である。

30

【0107】

同様に、抗体、断片、又は構築体の結合特性を変更し、より望ましい特性を伴う分子を得るために、本願明細書において提供された指針を使用することも当業者の能力の範囲内である。例えば、一旦望ましい特性を有する抗体が同定されたならば、ランダム又は位置指定突然変異誘発を用い、抗体の変種を作成することができ、並びにそれらの変種は、望ましい特性についてスクリーニングすることができる。

【0108】

当該技術分野において公知の常法を用い、当業者は、L32 scFvの結合能を有する追加の抗体又はそれらの断片を決定することもできる。例えば追加の抗体は、本願明細書に説明されたバイオパンニング法を用い単離し、ここでL32が結合する分子又は細胞を用い、特定のファージディスプレイライブラリー、特に白血病、リンパ腫、及び骨髄腫患者から調製されたライブラリーをスクリーニングすることができる。

40

【0109】

本発明の抗体及び断片は、それらの調製及び同定を、並びに病期決定を含む診断又は予後判定を補助するために、それらに挿入又は付着され得るようなタグを有してもよい。このタグは、後にその分子から除去することができる。有用なタグの例は以下を含む：AU1、AU5、BTag、c-myc、FLAG、Glu-Glu、HA、His6、HSV、HTTPhh、IRS、KT3、プロテインC、S-TAG(登録商標)、T7、V5、及びVSV-G(Jarvik及びTelmer, Ann. Rev. Gen., 32: 601-1

50

8 (1998))。このタグは好ましくは、c-myc又はKAKである。

【0110】

抗体、それらの断片又はそれらの構築体、ペプチド、ポリペプチド、蛋白質、並びにそれらの断片及び構築体は、原核又は真核発現システムのいずれかにおいて作成することができる。原核又は真核システムにおいて抗体及び断片を作成する方法は、当該技術分野において周知である。

【0111】

本発明において定義され及び本願明細書において考察されたような、真核細胞システムは、遺伝子操作法によるペプチド又はポリペプチドの作成のための発現システムと称され、ここで宿主細胞は真核細胞である。真核発現システムは、哺乳類システムであってよく、哺乳類発現システムにおいて作成されたペプチド又はポリペプチドは、精製後には、実質的に哺乳類夾雑物を含まないことが好ましい。有用な真核発現システムの他の例は、酵母の発現システムを含む。

10

【0112】

本発明のペプチド又はポリペプチドの生成のための好ましい原核システムは、発現ベクターのための宿主としてE.コリ(E.coli)を使用する。E.コリシステムにおいて生成されたペプチド又はポリペプチドは、精製後、実質的にE.コリ夾雑蛋白質を含まない。原核発現システムの使用は、本発明のために提供された一部又は全ての配列のN-末端にメチオニン残基を追加してもよい。ペプチド又はポリペプチドの完全な発現を可能にするための、ペプチド又はポリペプチド生成後のN-末端メチオニン残基の除去は、当該技術分野において公知のように行うことができ、その一例は、適当な条件下でのアエロモナス(Aeromonas)アミノペプチダーゼの使用である(米国特許第5,763,215号)。

20

【0113】

好ましい本発明の態様において、抗体又はそれらの断片を作成するプロセスは、下記の工程を含む：(a)ファージディスプレイライブラリーを提供する工程；(b)配列番号:1のscFv抗体断片の結合能を有する抗体又はそれらの断片が結合することができる分子又は細胞を提供する工程；(c)この分子又は細胞に結合するオリゴペプチド又はポリペプチドをディスプレイファージ粒子に関して、ファージディスプレイライブラリーをパンニングする工程；並びに、(d)抗体又はそれらの結合断片を有し、この分子又は細胞に結合するペプチド又はポリペプチドを有する、少なくとも1種の抗体又はそれらの結合断片を有する抗体又はそれらの断片を作成する工程。

30

【0114】

本発明の抗体及びポリペプチドは、薬物、毒素、及び放射性同位元素などの様々な医薬品と、並びに任意に医薬として有効な担体と、複合、例えば会合、組合せ、融合、又は連結し、抗体/ポリペプチド並びに抗疾患活性及び/又は抗癌活性を有する医薬品を含む、ペプチド-薬物組成物を形成することができる。このような組成物は、診断目的に使用してもよい。

【0115】

本発明に有用な担体の例は、デキストラン、HPMA(親水性ポリマー)、又は親水性ポリマーのようないずれか他のポリマーに加え、それらの誘導体、組合せ及び修飾物を含む。あるいは、scFv Y1分子により飾られたリポソーム(例えば、Doxil、ドキソルビシンを大量に含有する市販のリポソーム)のような、装飾されたリポソームを使用することができる。このようなりポソームは、1種又は複数の所望の物質を含有するように調製し、本発明の抗体と混合し、高い薬物対抗体の比を提供することができる。

40

【0116】

あるいは、抗体又はそれらの断片と物質の間の連結は直接連結であってよい。2個又はそれよりも多い隣接分子間の直接連結は、分子内の元素又は元素群の間の化学結合により作成され得る。この化学結合は、例えば、イオン結合、共有結合、疎水結合、親水結合、静電気結合、又は水素結合であることができる。これらの結合は、例えば、アミド、カーボン-スルフィド、ペプチド、及び/又はジスルフィド結合であることができる。抗体を

50

この物質又はリンカーに付着するために、共有結合の形成に関して当該技術分野において公知であるように、アミン、カルボキシ、ヒドロキシル、チオール及びエステル官能基を使用することができる。

【0117】

ペプチドと物質の間又はペプチドと担体の間、又は担体と物質の間の連結は、リンカー化合物を介してもよい。ここにおいて、本願明細書及び「特許請求の範囲」において使用されるように、リンカー化合物は、2種又はそれよりも多い部分を連結する化合物として定義される。リンカーは、直鎖又は分枝鎖であることができる。分枝したリンカー化合物は、二分枝(double-branch)、三分枝、又は四又はそれよりも多く分枝した化合物で構成される。本発明において有用なリンカー化合物は、ジカルボン酸、マレイミドヒドラジド、PDPH、カルボン酸ヒドラジド、及び小ペプチドを有する群より選択されるものを含む。

10

【0118】

本発明で有用なリンカー化合物のより具体例は、以下を含む：(a)コハク酸、グルタル酸、及びアジピン酸などの、ジカルボン酸；(b)N-[マレイミドカプロン酸]ヒドラジド、4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシルヒドラジド、及びN-[マレイミドウンデカン酸]ヒドラジドなどの、マレイミドヒドラジド；(c)(3-[2-ピリジルジチオ]プロピオニルヒドラジド)；並びに、(d)2~5個の炭素原子から選択される、カルボン酸ヒドラジド、並びにそれらの誘導體、組合せ、修飾物及びアナログ。

【0119】

小ペプチドリナーを使用する直接カップリングを介した連結も、有用である。例えば、例えば、抗癌剤ドキソルビシンの遊離糖と、scFvの間の直接カップリングは、小ペプチドを用いて実現することができる。小ペプチドの例は、AU1、AU5、BTag、c-myc、FLAG、Glu-Glu、HA、His6、HSV、HTTPhH、IRS、KT3、プロテインC、S-TAG(登録商標)、T7、V5、VSV-G、及びKAXを含む。

20

【0120】

本発明の抗体、及びそれらの断片は、放射性同位元素のような造影剤(指標マーカーとも称される)に結合、それに複合体化、それと複合体化、又はさもなければそれと会合することができる。並びにこれらの複合体を、診断、予後判定、又は病期決定及び造影を目的に使用することができる。このような放射性同位元素-抗体(又は断片)複合体を有するキットが提供される。

30

【0121】

診断、予後判定、又は病期決定において有用な放射性同位元素の例は、¹¹¹インジウム、¹¹³インジウム、^{99m}レニウム、¹⁰⁵レニウム、¹⁰¹レニウム、^{99m}テクネチウム、^{121m}テルリウム、^{122m}テルリウム、^{125m}テルリウム、¹⁶⁵ツリウム、¹⁶⁷ツリウム、¹⁶⁸ツリウム、¹²³ヨウ素、¹²⁶ヨウ素、¹³¹ヨウ素、¹³³ヨウ素、^{81m}クリプトン、³³キセノン、⁹⁰イットリウム、²¹³ビスマス、⁷⁷臭素、¹⁸フッ素、⁹⁵ルテニウム、⁹⁷ルテニウム、¹⁰³ルテニウム、¹⁰⁵ルテニウム、¹⁰⁷水銀、²⁰³水銀、⁶⁷ガリウム及び⁶⁸ガリウムを含む。好ましい放射性同位元素は、X-線又はいずれか適当な常磁性イオンに対して不透明(opaque)である。

【0122】

指標マーカー分子は、蛍光マーカー分子であることもできる。蛍光マーカー分子の例は、フルオレセイン、フィコエリスリン、もしくはローダミン、又はそれらの修飾物又は複合体を含む。

40

【0123】

指標マーカーに複合された交代又は断片は、患者由来の細胞を含有する試料を提供し、及び本発明の抗体が患者の細胞に結合しているかどうかを決定し、これによりその患者がその疾患のリスクがあるか又は罹患しているかを示すことにより、診断、予後判定又は病期決定に使用することができる。更に、本発明は、患者由来の細胞を含有する試料を提供し、及びこの患者由来の細胞を本発明の抗体と共にインキュベーションすることにより、患者から腫瘍細胞をパーズングする方法も提供する。このような活性は、in vivo、in vitro、又はex vivoにおいて行うことができる。In vivo又はex vivoにおいて行われる場合

50

、造影剤は、許容できないレベルまで、患者に危害を及ぼさない点で生理学的に許容できることが好ましい。許容できる危害レベルは、疾患重症度及び他の選択肢の利用可能性のような判定基準を用い、臨床医により決定することができる。

【0124】

癌に関して、患者における病期決定は一般に、腫瘍のサイズ、型、局在及び侵襲を基に疾患の分類を決定することに関連している。腫瘍の特徴により癌を分類するための分類システムのひとつは、「TNM Classification of Malignant Tumours」(第6版)(L.H.Sobin編集)であり、これは本願明細書に参照として組入れられており、並びにこれは癌の病期を、T、N及びMカテゴリーに分類し、ここでTは、そのサイズ及び局在に従い、原発性腫瘍を表し、Nは、限局性リンパ節を表し、並びにMは、遠隔転移を表す。加えて数値I、II、III及びIVを用い、病期を表し、並びに各数値は、TNM因子の可能性のある組合せを意味する。例えば、病期I乳癌は、TMN群により定義され：T1、N0、M0：これはT1 - 腫瘍は、直径2cm以下、N0 - 限局性リンパ節転移なし、M0 - 遠隔転移なしを表している。別のシステムが、AML病期決定に使用され、これは、通常の処理及び細胞化学染色の下で観察された形態学を用いる、FABシステムを基に分類された亜型を伴う。

10

【0125】

加えて最近提唱された造血組織及びリンパ組織の新生物疾患の世界保健機構(WHO)の病期決定又は分類は、(AMLについて特定する)従来の疾患のFAB-型範疇に加え、特異的細胞遺伝学的知見と相関している追加病型及び脊髄形成異常に関連したAMLを含む。他のものは、病理学的分類を提唱している。例えばAMLに特異的なひとつの提唱は、細胞遺伝学的転座に関連し、並びに形態学的評価及びイムノタイピングにより信頼できると認識され得る病型、並びに脊髄形成異常的变化に関連した重要性を組込んでいる病型を含む。このシステムは、細胞遺伝学的又は分子遺伝学的研究により裏付けられ、並びに新たな認識可能な臨床病理学的実体が説明されるので、拡大されるであろう(Arber, Am. J. Clin. Pathol., 115(4): 552-60 (2001))。

20

【0126】

本発明は、指標マーカー分子又は造影剤に連結した本発明のペプチドを有する造影剤を有する、治療前、治療中又は治療後に、治療効力のin vitro分析のための、診断、予後判定、又は病期決定するキットを提供する。本発明は更に、下記の工程を含む、癌、より詳細に述べると腫瘍の局在化の診断、生存の予後判定、及び病期決定又は造影のための造影剤を使用する方法を提供する：(a)細胞を組成物と接触する工程；(b)細胞に結合した放射能を測定する工程；その結果、(c)腫瘍を可視化する工程。

30

【0127】

適当な造影剤の例は、蛍光色素、例えばFITC、PEなど、並びに蛍光蛋白質、例えば緑色蛍光蛋白質などを含む。他の例は基質と反応し、呈色変化のような、認識可能な変化を生じる、放射性分子及び酵素を含む。

【0128】

一例において、このキットの造影剤は、FITCのような蛍光色素であり、並びにこのキットは、癌の、より詳細に述べると血液-関連した癌、例えば白血病、リンパ腫、及び骨髄腫などの治療効力の分析を提供する。FACS分析を用い、例えば、診断時、治療中、寛解期間及び再発期間などの、各病期で、造影剤により染色された細胞の割合及び染色強度を決定する。

40

【0129】

本発明の抗体及びそれらの断片は、抗癌剤、抗新生物薬、抗ウイルス薬、抗転移薬、抗炎症薬、抗血栓薬、抗再狭窄薬、抗凝集薬、自己免疫疾患治療薬、抗接着薬、抗心臓血管疾患薬、医薬品又は他の疾患治療薬に結合し、それと複合体化し、さもなければそれと会合される。物質は、ヒト、ウシ、ウマ、ブタ、マウス、イヌ、ネコ又はいずれか他の恒温動物を含むが、これらに限定されるものではない哺乳類の予防的治療又は診断に有用な物質を意味する。

【0130】

50

このような物質の例は、アシクロビル、ガンシクロビル及びジドブジンを含む、抗ウイルス薬；シロスタゾール、ダルテパリンナトリウム、レビパリンナトリウム、及びアスピリンを含む、抗血栓/抗再狭窄薬；ザルトプロフェン、プラノプロフェン、ドロキシカム、アセチルサリチル酸17、ジクロフェナック、イブプロフェン、デキシブプロフェン、スリンダック、ナプロキセン、アムトルメチン、セレコキシブ、インドメタシン、ロフェコキシブ、及びニメスリドを含む、抗炎症薬；レフルノミド、デニロイキンジフチトックス、スプレウム、WinRho SDF、デフィプロチド、及びシクロホスファミドを含む、自己免疫疾患治療薬；並びに、リマプロスト、クロルクロメン、及びヒアルロン酸を含む、抗接着/抗凝集薬を含むが、これらに限定されるものではない。

【0131】

10

例証的医薬品は、アントラサイクリン、例えば、ドキソルピシン(アドリアマイシン)、ダウノルピシン(ダウノマイシン)、イダルピシン、デトルピシン、カルミノマイシン、エピルピシン、エソルピシン、更にはモルホリノ及びそれらの置換された誘導体及び組合せを含む。更なる医薬品の例は、シスプラチン、タキソール、カリケアマイシン、ピンクリスチン、シタラピン(Ara-C)、シクロホスファミド、プレドニソロン、フルダラビン、イダルピシン、クロラムブシル、インターフェロン、ヒドロキシ尿素、テモゾロミド、タリドミド、及びブレオマイシン、並びにそれらの誘導体、組合せ及び修飾物を含む。

【0132】

癌細胞の増殖阻害は、例えば(i)癌性又は転移性増殖の防止、(ii)癌性又は転移性増殖の緩徐化、(iii)癌細胞の増殖プロセス又は転移プロセスの総合的防止と同時に、無傷で生存する細胞の残存、(iv)癌細胞の微小環境との接触の妨害、又は(v)癌細胞の殺傷を含む。

20

【0133】

白血病細胞の増殖阻害は、例えば、(i)白血病性又は転移性増殖の防止、(ii)白血病性又は転移性増殖の緩徐化、(iii)白血病細胞の増殖プロセス又は転移プロセスの総合的防止と同時に、無傷で生存する細胞の残存、(iv)癌細胞の微小環境との接触の妨害、又は(v)白血病細胞の殺傷を含む。

【0134】

本発明の抗体及び断片が有用に連結し得る疾患治療薬、抗癌剤、及び抗白血病薬の例は、毒素、放射性同位元素、及び医薬品を含む。

30

【0135】

毒素の例は、ゲロニン、シュードモナス(Pseudomonas)菌体外毒素(PE)、PE40、PE38、ジフテリア毒素、リシン、又はそれらの誘導体、組合せ及び修飾物を含む。

【0136】

放射性同位元素の例は、線-放射体、ポジترون-放射体、及び局在化及び/又は治療に使用することができるx-線放射体、並びに治療に使用することができる線-放射体及び線-放射体を含む。診断、予後判定及び病期決定に有用であるとして先に説明された放射性同位元素は、治療のためにも有用である。

【0137】

抗癌剤又は抗白血病薬の限定的でない例は、ドキソルピシン(アドリアマイシン)、ダウノルピシン(ダウノマイシン)、イダルピシン、デトルピシン、カルミノマイシン、エピルピシン、エソルピシン、更にはモルホリノ及びそれらの置換された誘導体、組合せ及び修飾物を含む。医薬品の例は、シスプラチン、タキソール、カリケアマイシン、ピンクリスチン、シタラピン(Ara-C)、シクロホスファミド、プレドニソロン、ダウノルピシン、イダルピシン、フルダラビン、クロラムブシル、インターフェロン、ヒドロキシ尿素、テモゾロミド、タリドミド、及びブレオマイシン、並びにそれらの誘導体、組合せ及び修飾物を含む。好ましくは抗癌剤又は抗白血病薬は、ドキソルピシン、モルホリノドキソルピシン、又はホルホリノダウノルピシンである。

40

【0138】

ひとつの態様において、本発明は、本抗体を投与することによる、ADCCの誘導又は活性

50

化の方法を提供する。従ってこれらの抗体は、ADCCを活性化及び/又はナチュラルキラー(NK)細胞(例えば、CD56+)、T-細胞傷害性細胞(例えば、CD8+)及び/又は単球を刺激し、これは細胞溶解を引き起こし得る。一般に、Fc領域を含む抗体又はその抗体の一部の投与後、該抗体は、エフェクター細胞、例えばNK細胞の上のFc受容体(FcR)に結合し、パーフォリン及びグランザイムBの放出を引き起こし、これはその後アポトーシスにつながる。様々な因子がADCCに影響を及ぼすことができ、これは関与したエフェクター細胞の型、サイトカイン(例えばIL-2及びG-CSF)、インキュベーション時間、細胞表面に存在する受容体数、及び抗体親和性を含む。

【0139】

ひとつの態様において、本発明の医薬組成物は、配列番号:1のscFv抗体断片の結合能を伴う抗体又はそれらの断片並びに医薬として許容できる担体を含む。抗体又はそれらの断片は、細胞ローリング、炎症、感染症、自己免疫疾患、腫瘍細胞もしくは白血病細胞の転移、増殖及び/もしくは複製、又は腫瘍を有する患者における腫瘍細胞の数、又は白血病を有する患者における白血病細胞の数を、阻害もしくは治療するのに有効な量で存在することができる。あるいは、抗体又はそれらの断片は、腫瘍細胞又は白血病細胞の致死率を増大するのに有効な量で存在することができる。同じく代わりに、抗体又はそれらの断片は、疾患治療薬により損傷される罹患した細胞、抗癌剤により損傷される腫瘍細胞、又は抗白血病薬により損傷される白血病細胞の感受性を変更するのに有効な量で存在することができる。更に代わりに、抗体又はそれらの断片は、腫瘍を有する患者における腫瘍細胞又は白血病を有する患者における白血病細胞の数を減少するのに有効な量で存在する

【0140】

本発明の抗体、構築体、複合体、及び断片は、いずれか適当な方法により、それが必要な患者に投与することができる。例証的方法は、静脈内、筋肉内、皮下、外用、気管内、髄腔内、腹腔内、リンパ内、鼻腔内、舌下、経口、経直腸、経膈、呼吸器内、頬腔内、皮内、経皮又は胸膜腔内投与を含む。

【0141】

静脈内投与について、製剤は、好ましくは、患者に投与された量が、所望の組成物約0.1mg~約1000mgの有効量であるように調製されるであろう。より好ましくは、投与される量は、所望の組成物約1mg~約500mgの範囲である。本発明の組成物は、広範な用量範囲にわたり有効であり、並びに治療される疾患の詳細、患者の体内におけるペプチドもしくはポリペプチド-ベースの医薬組成物の半減期、抗体又はそれらの断片と複合体化された物質の並びに医薬組成物の物理的及び化学的特性、医薬組成物の投与様式、治療又は診断される患者の詳細、更には治療する医師により重要であると見なされた他のパラメータなどの要因に左右される。

【0142】

経口投与のための医薬組成物は、いずれか適当な形であることができる。例として、錠剤、液剤、乳剤、懸濁剤、シロップ剤、丸剤、キャプレット剤及びカプセル剤である。医薬組成物の製造法は、当該技術分野において周知である(例えば、Remington、「The Science and Practice of Pharmacy」、Alfonso R. Gennaro(編集)Lippincott, Williams & Wilkins(出版)参照)。

【0143】

この医薬組成物は、時間を指定した、持続した、時間間隔を空けた、又は連続した放出を促進するように、製剤することもできる。この医薬組成物は、装置、例えば時間を指定した、持続した、時間間隔を空けた、又は連続した放出装置内で投与してもよい。外用投与に関する医薬組成物は、クリーム剤、軟膏剤、ローション剤、貼付剤、液剤、懸濁剤、凍結乾燥剤、及びゲル剤などの、いずれか適当な形であることができる。本発明の抗体、それらの構築体、複合体及び断片を含む組成物は、通常の医薬として許容できる希釈剤、賦形剤、担体などを含んでもよい。錠剤、丸剤、キャプレット剤及びカプセル剤は、通常の賦形剤、例えば乳糖、デンプン、及びステアリン酸マグネシウムなどを含有することが

できる。坐剤は、ワックス及びグリセロールのような賦形剤を含有することができる。注射溶液は、滅菌したパイロジェン非含有の媒質、例えば生理食塩水を含有し、並びに緩衝剤、安定化剤又は保存剤を含んでもよい。通常の腸溶性コーティングも使用することができる。

【0144】

前述の抗体又はそれらの断片及びそれらの医薬組成物は、それが必要な患者において、疾患を治療する(例えば、治療は、疾患の作用の改善、疾患の予防、又は疾患進行の阻害を含む)方法において使用することができる。このような方法は、細胞ローリング、炎症、自己免疫疾患、腫瘍細胞又は白血病細胞の転移、増殖及び/もしくは複製、又は腫瘍を有する患者における腫瘍細胞もしくは白血病を有する患者における白血病細胞の数の増加の阻害又は治療を含む。加えてこのような方法は、腫瘍細胞もしくは白血病細胞の致死率を増加すること、又は疾患治療薬により損傷される罹患した細胞、抗癌剤により損傷される腫瘍細胞、もしくは抗癌剤により損傷される白血病細胞の感受性を変更することを含む。このような方法は、腫瘍を有する患者において腫瘍細胞数を及び白血病を有する患者において白血病細胞数を減少することも含む。

10

【0145】

本発明は、患者由来の細胞を含有する試料を提供し、及び患者由来の細胞を本発明の抗体と共にインキュベーションすることにより、患者から腫瘍細胞をパーズングする方法も提供する。ひとつの態様において、パーズングはex vivoで行われる。

【実施例】

20

【0146】

下記実施例は、本発明の理解を補助し及び更に例証するために示されているが、いかなる意味においてもその範囲を制限することは意図されてはならず及びそのように構築されてもいない。具体的試薬及び反応条件が説明されているが、本発明の範囲により包含される変更を行うことができる。

【0147】

実施例1

本実施例は、L32 scFv抗体断片の選択、作成、及び最初の特徴決定を明らかにしている。簡単に述べると、scFv抗体断片を展示しているファージディスプレイライブラリーを利用し、標的化分子を入手及び作成し、並びにフローサイトメトリー、特に蛍光標示式細胞分取器(FACS)を用い、特異的ファージクローンを同定及び単離し、そのペプチド又はポリペプチドは標的細胞を認識する。ここで使用したファージディスプレイライブラリーは、49名の免疫感作していないヒトドナー由来の末梢血リンパ球から構築された。

30

【0148】

ファージクローンは、バイオパンニングとして公知の多工程手法により選択及び同定した。バイオパンニングは、蛋白質リガンド変種をディスプレイしているファージ(ファージディスプレイライブラリー)を、標的細胞と一緒にインキュベーションし、洗浄技法により結合していないファージを除去し、及び結合したファージを特異的に溶離することにより、実行した。溶離されたファージクローンは、任意に増幅し、その後標的に最良に結合する抗体断片を生じる、それらのファージクローンに有利な特異的配列のプールを濃縮する追加の結合及び任意の増幅サイクルを行った。数ラウンドのパンニング後、個々のファージクローンを特徴決定し、及びこれらのクローンにより展示されたペプチドの配列は、ファージピリオンの対応するDNAの配列決定により決定される。

40

【0149】

本発明において、T-リンパ腫細胞のスクリーニングを、最初のバイオパンニング工程について定義されないエピトープに対して行い、引き続きクローン選択を、所望の標的細胞(例えば、B-白血病細胞、B-CLL細胞、AML細胞、多発性骨髄腫細胞、及び転移細胞)、未知である標的化された細胞表面マーカで行った。

【0150】

L1プロトコールを使用し、L32 scFv抗体クローンを、無傷のT-リンパ腫細胞上のファ

50

ジディスプレイライブラリーのパンニングにより発見した。このプロトコルは、予備洗浄から始まる。患者由来の 2×10^7 個の凍結白血球/リンパ腫T細胞を含有するアリコート1mlを、 -70°C で貯蔵し、 37°C で急速解凍し、直ぐに10mlの冷2% PBS-ミルク (MPBS) に希釈した。細胞を、 $120 \times g$ で5分間室温 (RT) で回転し、2回洗浄し、MPBS中に懸濁し、及び血球計算器で計測した。scFvディスプレイファージライブラリー (Nissimら、EMBO J., 13: 692-98 (1994)) を、MRCの合意で用いた。このライブラリーは、 V_H 及び V_L ドメインが可動性ポリペプチドにより連結されたscFv断片を展示するファージミドライブラリーとして当初構築された。このファージミドライブラリーにおいて展示されたscFvは、このファージの少量のコート蛋白質pIIIのN-末端に融合されており、これはその後pHEN1ベクターにサブクローニングされた。抗体断片のレパトアは、最初に免疫感作されていないヒトの末梢血リンパ球の再配列されたV-遺伝子からのPCRにより作成した(「未変性のレパトア」と称す)。このレパトアを多様化するために、長さ4~12残基である重鎖CDR3をコードしているランダムヌクレオチド配列を、49種のクローン化されたヒト V_H 遺伝子セグメントのバンクに照会した。それに由来する全てのクローン中の融合した V_L 断片は、生殖細胞系 IGLV3S1の単独の未熟なV遺伝子であり、約 10^8 クローンの1-ポットライブラリーを作成した。

10

【0151】

L32 scFv抗体クローンの選択は、ファージミド (Nissimライブラリー) の 10^6 個のT細胞、 10^{11} 個のコロニー形成単位 (CFU) のファージミド (Nissim Library社)、及び 10^{13} 個の野生型バクテリオファージM13を含有するMPBSの最終容量0.5ml中で、 4°C で1時間ゆっくり攪拌しながら行った。その後前述のように、細胞をMPBSで懸濁し、 $120 \times g$ 、 4°C で遠心することにより、細胞洗浄を行った。この選択+細胞洗浄手法を、3回反復した。

20

【0152】

選択の1回目のラウンド後、0.1Mグリシン $150 \mu\text{l}$ (pH2.2) と共に細胞を5分間室温でインキュベーションすることにより、結合したファージミドを、Tリンパ腫細胞から溶離した。中和後、細胞を遠心し及び廃棄し、溶離したファージ粒子を含有する上清液を収集し、E1ストックと称した。このE1ストックを、指数増殖しているTG-1細胞1mlの添加、及び 37°C で30分間のインキュベーションにより増幅した。アリコートを、力価決定目的で播種し、残存容量を2xTY/AMP (1.6%トリプトン、1%酵母抽出物、0.5% NaCl、及び $100 \mu\text{g/ml}$ アンピシリン) を含有する大きいプレート (150mm) 上に播種した。プレートは 30°C で一晩インキュベーションした。パンニングの各ラウンド後の出力を決定するために、力価決定プレート上のコロニーを数え、及び総出力を計算した。

30

【0153】

細菌株TG-1及びHB2151の新鮮な細菌培養物を、 A_{600} 値0.5~0.9までの細胞の増殖 (指数増殖している細胞) により、感染 (増幅) のために調製した。E.コリ TG-1細胞を、ファージ繁殖のために使用し、及びE.コリ HB2151細胞をscFv蛋白質生成のために使用した。大きいプレートのコロニーを、掻き取り、プールした。アンピシリン耐性E.コリ TG-1細胞のアリコート ($\sim 10^7$) を、 A_{600} 値 ~ 0.5 となるまで、液体培地上で増殖し、その後ヘルパーファージ (VSC-M13、Stratagene社) により感染し、大きく増幅したファージミドストックを作成した。ファージミドは、PEG沈降法により回収した (Harrisonら、Methods in Enzymology, 267: 83-109 (1996))。前述の増幅したE1ストックのおよそ 10^{12} 個ファージミド/mlを、T細胞に対するパンニングの引き続きのラウンドに使用した。

40

【0154】

「連続パンニング」の2及び3回目のラウンドを、以下の修飾を行い、本質的には1回目のパンニング手法について説明されているように行った: (i) 2回目の連続パンニングについて、 $\sim 10^{11}$ 個のファージミドを使用し、並びに(ii) 選択及び洗浄後、結合したファージミドを、PBS/1% BSA+ATP (10mM) の $50 \mu\text{l}$ 中で、これらの細胞の15分間、室温でのインキュベーションにより溶離した。細胞を遠心し、上澄み液を収集した。本手法の2回目のラウンドから得た溶離されたファージミドを含む出力は、E1AT1と称し、これを増幅以外は前述に従う連続パンニングの3回目のラウンドに使用した。2回目のラウンドのようにATP溶離後、ファージミドを、前述のように、TG-1細胞中で増幅した。最終の増幅したストック

50

を、E1AT2と称した。感染、力価決定、及び配列解析のために、ひとつのアリコート(5 μ l)を、TG-1細菌培養液と混合した。残りの容量(45 μ l)は、増幅及び貯蔵のために、1.3mlのTG-1細胞浮遊液とインキュベーションした。

【0155】

パンニングに使用されたファージミドの推定数(入力)及び溶離された結合したファージミドの推定数(出力)を、L1バイオパンニングプロトコールの3連続工程について、表2にまとめた。各出力結果に関する細胞給源及び溶離媒体を列記し、更に各分離ストックの識別に使用した用語を記した。

【0156】

【表2】

10

表2.

入力ストック	細胞給源	溶離	出力	増幅されたストック
Nissimライブラリー-10 ¹²	Tリンパ腫	酸	3.3x10 ⁶	E1
E1-10 ¹¹	Tリンパ腫	ATP(10mM)	500	E1AT1*
E1AT1-500	Tリンパ腫	ATP(10mM)	37	E1AT2

20

*溶離されたが増幅されない

【0157】

表1に示した結果は、ATP溶離が2回目及び3回目のラウンドに使用された場合は、溶離されたファージ数は非常に小さく、これはファージ特異性の増加の可能性を示すことを示唆している。

【0158】

パンニング後、各ラウンド由来のいくつかのクローンを、配列決定のために選択した。この項に提示されたアミノ酸配列は、下記のようなものである：(a)選択されたクローン中に1回よりも多く出現した配列、(b)重鎖のみのCDR3領域の配列(VH-CDR3)、及び(c)各単離されたクローンのVH生殖細胞系の種。

30

【0159】

【表3】

表3.

クローン	VH-CDR3サイズ	VH-CDR3配列	生殖細胞系	出力	頻度
L32	8	Leu Asn Pro Lys Val Lys His Met(配列番号:4)	VH3-DP32	E1AT2	4/15
L31	7	Leu Arg Gly Gly Asn Ala Met(配列番号:5)	VH3-DP32	E1AT2	5/15

40

【0160】

2種のクローンL32及びL31は、L1バイオパンニングプロトコールに従い同定し、それら

50

の配列を表3に示した。CDR3領域のアミノ酸残基の数(VH-CDR3サイズ)及び特異的CDR3配列を、各クローンについて指定された生殖細胞系と共に示した。加えて、L1プロトコールについて配列決定されたクローン総数の関数として、特異的クローン型が単離された回数(頻度)が示された。興味深いことに、このライブラリーは、異なる5種のVHファミリー(VH1、VH2、VH3、VH4、及びVH6)由来のVHを含み、VH3が利用した遺伝子の~47%を構築しているが、単離されたクローンは両方ともVH3ファミリー(DP32)であった。これは、scFv精製プロセスにとって利点であり、その理由は、プロテインAセファロースは、VH3ファミリー由来のscFvの精製には使用され、VH3以外のVHファミリー由来のクローンを精製するためには使用することができないからである。

【0161】

10

実施例2

本実施例は、比較試験において対照として使用される、様々なscFv抗体の作成を説明している。

【0162】

Y1及びY17 scFv抗体クローンの単離及び特徴決定は、米国特許出願第10/032,423号；第10/032,037号；第10/029,988号；第10/029,926号；第09/751,181号；及び、第60/258,948号、並びに国際出願PCT/US01/49442号及びPCT/US01/49440号に詳細に開示されている。

【0163】

加えて、陰性対照scFvクローンを選択した。全ての結合実験に関して、単独のクローンを、ナイーブ(naive)ライブラリーから採取した(選択前)。ファージストック及び可溶性scFvで、N14と称されるものを、このクローンから調製した。配列解析は、これがV_H4-DP65遺伝子ファミリーに属することを示している。N14 CDR3と称される、このクローンによりコードされた11量体 V_H-CDR3の配列は、配列番号:6である。追加の陰性クローンN01を、結合分析実験に用いた。クローンN01(組換えB型肝炎ウイルス[HBV]粒子に対し反応性)は、V_H3-DP35ファミリーに属し、及びこのクローンによりコードされた9量体 V_H-CDR3の配列は、N01CDR3と称され、配列番号:7である。

20

【0164】

TM scFv抗体クローン(下記)は、T-リンパ腫細胞膜上のファージディスプレイライブラリーのパンニングにより、TMプロトコールを用い単離した。このプロトコールにおいて、T細胞(2x10⁷個)の予備洗浄を、先にL1プロトコールにおいて説明されたように行った。T細胞の予備洗浄後、当初のNissimライブラリーからの10¹²個のファージミドを含有するMPBS 2mlの添加により、固定されたTリンパ腫細胞膜上で選択を行った。このチューブをゆっくり30分間攪拌し、その後攪拌せずに更に90分間インキュベーションした(両工程とも室温で)。過剰な未結合のファージミドを、チューブ内容物のデカント、及びチューブのPBS、0.1% Tweenによる10回洗浄、引き続きのPBSによる10回洗浄により除去した。溶離のために、指数増殖しているE.コリ TG-1細胞(2ml)を、このチューブに直接添加し、及び37°Cでゆっくり攪拌しながらインキュベーションした。前述のように、アリコートをし、力価決定のために播種し、及び残りの容量を増幅のために播種した。加えて、増幅をL1プロトコールに説明されたように行った。選択法は、先に増幅したストックの10¹¹個のファージミドを用い、2回の追加ラウンドのために繰返した。固定されたT細胞膜上の、3回目のパンニング法の増幅したストックの第一のクローンを、TM1.1-myc+/TM1.1と称した。いくつかのscFv抗体、特にTM1.1及びmycタグを伴うそれらの変種(TM1.1-myc+)を、このクローンから調製した。

30

40

【0165】

TM1.1-myc+クローンに加え、下記の追加クローンを、TMプロトコールを用い、単離した。3回目の膜パンニングの増幅したストックを用い、無傷のT-リンパ腫細胞をパンニングした。この手法は、2x10⁷個細胞及び10¹⁰個ファージミドを使用し、本質的に前記L1プロトコールに説明したように行った。4°Cで2時間インキュベーションした後、結合したファージミドを、洗浄した細胞ペレットから、トリプシン:EDTA(0.25%:0.05%)50µlにより溶離し、その後FCSの50µlを添加し中和した。力価決定及び増幅に関して、E.コリ TG-

50

1培養液 ($A_{600} = 0.5$) 1mlを使用した。TM2と称される増幅したストックを、前述のTリンパ腫細胞上のパンニングの追加のラウンドに使用した。最終ストックは、TM3と称した。TMプロトコールに従った結果として単離されたscFvの配列を、表4に示した。scFvのFITC標識後の結合活性も、scFv特異性の保持を証明するために評価した(実施例7参照)。例えば、T-ALL細胞に結合するTM3.13の特異性を、FACS分析に従いその結合により証明した(図1参照)。

【0166】

【表4】

表4.

クローン	VH-CDR3 サイズ	VH-CDR3配列	生殖細胞系	出力	頻度
TM2.31	7	Leu Thr His Arg Ser Ser Arg	VH3-DP46	TM2	2/10
TM2.23	7	Thr Gln Arg Arg Asp Leu Gly	VH3-DP53	TM2	5/10
TM3.20	7	Lys Arg Val Ser Leu Leu Thr	VH3-DP70	TM3	1/7
TM3.18	7	Ser Tyr Arg Arg His Ser Arg	VH3-DP47	TM3	2/7
TM3.13	11	Arg Asp Lys Thr Thr Asn Phe Ty r Phe Met Lys	VH3-DP26	TM3	1/7

10

20

【0167】

実施例3

本実施例は、L32 scFvクローンの作成、精製、標識及び特徴決定を説明している。

【0168】

可溶性scFvの作成のために、当初のファージミドライブラリー構築に使用したベクターであるpHEN1を、scFv遺伝子とpIII遺伝子の接合部にコードされたアンバー停止コドンに伴うようにデザインした。従って、選択されたクローンのベクターが、ファージミド感染により非-抑制株であるE.コリ HB2151に導入される場合、このシステムは可溶性scFvの作成及び細菌の周辺細胞質への分泌が可能である(Harrisonら、Methods in Enzymol., 267: 83-109 (1996))。その後scFvは、培養ブロスから容易に取り出すことができる。可溶性scFvは、lacZプロモーターの制御下で生成され(Gilbert及びMuller-Hill、PNAS(US), 58: 2415 (1967))、これはその後IPTG(イソプロピルチオガラクトシド)で誘導される。

30

【0169】

配列番号:8の10個のアミノ酸のc-mycタグをコードしている配列は、ベクター内でアンバー突然変異の上流に含まれる。発現されたscFvのC-末端は、c-mycタグを保持し、これはマウス抗-mycタグ抗体(European Collection of Cell Culture (ECACC)から入手、9E10-ハイブリドーマ)を用い検出することができる。

【0170】

選択されたクローン及び対照クローンN01のscFvは全てVH3ファミリーに属し、プロテインAアフィニティカラム上での精製が可能である。各クローンの誘導された培養液から周辺細胞質画分(100~250ml)を調製し、及びプロテインAセファロースビーズと共にインキュベーションした。結合したscFvを、酸溶離(0.1Mグリシン、pH3.0)により、このカラムから回収し、その後溶離液をTris(pH8.0)により中和した。回収された蛋白質の濃度を、 A_{280} 測定により決定し、その後透析又はG-25セファロースカラムによりPBS緩衝液交換した。

40

【0171】

L1プロトコールから得たクローンL32のscFvも、VH3遺伝子ファミリー(DP-32)に属している。しかし周辺細胞質からの抽出後、5mM DTTが必要であり、これをプロテイン-Aアフ

50

イニティカラムへの試料の負荷前に添加し、その後先に説明されたように、プロテイン-Aセファロースビーズ及びPBS緩衝液交換により精製及び回収を行った。

【0172】

陰性クローンN14のscFvは、VH4遺伝子ファミリーに属し、これはプロテインAアフィニティカラム上では精製することができず、従ってこれはセファクリルS-200カラム上で精製した。ScFv N14は、60%硫酸アンモニウムを用い誘導された培養液200mlの周辺細胞質画分中の総蛋白質の沈降により精製した。このペレットを、2mlの0.1xPBS、5mM EDTA、5mM PMSF中に懸濁し、及びランニング緩衝液(0.1xPBS、5mM EDTA)で予め平衡化したセファクリルS-200カラム(1.5x90cm)上に負荷した。蛋白質を分画し、及びN14 scFvを含有する画分(SDS-PAGE及びウェスタン解析により検出)をプールし、凍結乾燥し、及び1/10容量のH₂O中に懸濁した。その後N14 scFv(未標識及びFITC-標識)を、FACS分析実験において、陰性対照として用いた。

10

【0173】

次に精製されたscFvを、FITCで標識した。各調製物から精製されたscFvおよそ1mgをPBS中に懸濁し、市販のFluoro-Tag FITC複合キット(Sigma-Aldrich社、セントルイス、MO)を製造業者の指示に従い使い、FITCに結合した。精製及びFITC標識後、各調製物のプロファイル(標識及び未標識)を、SDS-PAGE、ウェスタンブロット、セファデックス-75カラムを使用するHPLC(A₂₈₀及びA₄₉₅)、及び蛍光定量法により分析した。この分析は、N14 scFvの純度80%、及びVH3クローンの純度90%を示し、FITCの約2分子が、各scFv分子に複合していた(F/P比2:1)。

20

【0174】

実施例4

本実施例は、L32 scFvの洗浄した血小板及び血小板が豊富な血漿(PRP)への結合並びにL32 scFvの血小板凝集に対する作用を明らかにしている。

【0175】

血小板凝集試験に関して、血液は、3.8%クエン酸ナトリウムがはいった試験管に採取した。PRPを、250xgで10分間の遠心により調製した。クエン酸-ブドウ糖(ACD)液中の血小板濃縮物を、血液バンクから得た。血小板を単離し、ACD含有緩衝液で1回洗浄し、及び1:7の比で生理食塩水で洗浄した。これらの血小板は、各洗浄後、800gで10分間遠心し、及びタイロッド液(2mM MgCl₂、137mM NaCl、2.68mM KCl、3mM NaH₂PO₄、0.1%ブドウ糖、5mM HEPES及び0.35%アルブミン、pH7.35)中に懸濁させ、細胞数を計測した。

30

【0176】

PRP及び洗浄した血小板を全血液中、Lumiaggregometer(Chronolog社、ハバートン、PA)において、500rpm、37℃で回転させた。血小板懸濁液及び懸濁している媒体を通した光透過性の差異を、100%凝集として採用した。血小板凝集に対するL32の作用を、アゴニスト添加前の、様々な濃度のL32の添加により評価し、この作用を4分間記録した(図2)。

【0177】

洗浄した血小板を用い、凝集アッセイを行った。この反応混合液は、2x10⁸個の洗浄した血小板/ml及び4µg/mlブタのフォン・ビルブランド因子を含有している。37℃で3分間のインキュベーション後、リストセチン(凝集アゴニスト)0.4mg/mlを添加し、並びに凝集反応を4分間記録した。L32及び他のscFv抗体の血小板凝集に対する作用を、アゴニスト添加前の50µg/mlのscFvの添加により評価し、並びにこの作用を4分間記録した。L32の洗浄した血小板のvWF-依存型凝集反応に対する作用を、洗浄した血小板のふたつの試料において試験し(n=2)、公知の作用を有するscFvであるY1による凝集反応の排除とは対照的に、通常凝集反応(90%凝集反応)が認められた。TMプロトコールを用い単離されたTM1.1-myc+の作用も、対照として評価した。同じ条件で、Y1 scFv抗体は、リストセチンが誘導した血小板凝集を~70%阻害した(図2)。

40

【0178】

PRPを用いる凝集アッセイに関して、反応混合液は、PRP(~2x10⁸/ml)を含有した。37℃で3分間インキュベーションした後、リストセチン(凝集アゴニスト)1mg/mlを添加し、凝

50

集反応を4分間記録した。血小板懸濁液及びPPP(血小板の少ない血漿)を通した光透過性の差異を、100%凝集とみなした。L32の血小板凝集に対する作用は、アゴニスト添加前の50 $\mu\text{g/ml}$ L32 scFvの添加により、3名の異なるドナー由来のPRPにおいて評価し(n=3)、その作用を4分間記録した。L32 scFvのPRPへの添加後に、正常な凝集(90%凝集)が認められた(図2)。前述のように、L32の作用を、TM1.1及びY1のものと比較した。洗浄した血小板同様、Y1は、PRP血小板凝集を~70%阻害した。

【0179】

結論として、クローンL32の50 $\mu\text{g/ml}$ は、洗浄した血小板又はPRPの血小板凝集に対し有意な阻害作用を有さなかった。

【0180】

血小板のL32 scFv染色(結合)は、FACSによっても評価した。この方法は、蛍光マーカーによる染色強度を基にした測定に有用である。図3に示したように、Y1及びY1-myc+ scFv(c-mycタグを伴うグリコカリシン反応性Y1 scFv抗体)による染色は、PRPから染色した血小板を生じた。対照的に、L32 scFvによるこれらの血小板の染色後の蛍光シグナルは、対照抗体による染色と比べ、余り変化しなかった(図3のヒストグラムの比較、ここでTM1.1-myc+は、血小板関連したエピトープに結合していないscFvである)。

【0181】

実施例5

scFv L32の様々な異なる細胞株に対する結合を、FACSにより分析した。分析は、下記の3工程染色に従い行った：(i) L32；(ii)抗-単鎖抗体；及び、(iii)抗-ウサギFITC-標識された抗体。異なる細胞株を、L32結合後の細胞集団の幾何平均の陰性対照のそれに対する比に従い分類し、表5に示した。低い結合は比1の細胞に割当て、中等度の結合は1~4の範囲の比の細胞に割当て、及び高い結合は4よりも大きい比の細胞に割当てた。

【0182】

【表5】

表5.

L32高	L32中	L32低
KG-1 Jurkat	Molt-4 Hut78 HEL K562 CCRF-CEM HL60	Raji Daudi UMUC3 Namalwa

【0183】

これらの単鎖抗体によるこれらの細胞上のY1とL32の間の同じ結合部位の競合を調べた。このような実験のひとつにおいて、KG-1細胞(AML患者由来のヒト細胞株)に対するビオチン標識されたY1(Y1-myc+)についての標識されない抗体の競合を評価した。この結果を図4及び5に示した。示したように、L32は、Y1 scFvそれ自身同様、KG-1細胞上のY1結合について競合する。これらの結果は、予備的放射性受容体アッセイ試験により裏付けられ、ここでは、L32 scFvは、用量依存的に、 ^{125}I -標識されたY1 scFvのKG-1細胞への結合に部分的に置き換わった。

【0184】

標識されない抗体のKG-1細胞への結合におけるビオチン-標識されたL32scFv(0.5、2又は5 μg)と競合する能力は、競合試験において評価した。米国特許出願第10/032,423号；第10/032,037号；第10/029,988号；第10/029,926号；第09/751,181号；及び、第60/258,9

10

20

30

40

50

48号、並びに国際出願PCT/US01/49442号及びPCT/US01/49440号に示された結果は、Y1及び抗-CD162抗体は、CD162抗原への結合に関して競合することを開示している。FACS分析を用い、標識された抗体結合を測定し、結果を結合の幾何平均値として表した。これらの結果を表6にまとめ、これはY1 scFv及び抗-CD162抗体による抗体交換の濃度依存性を示している。標識されない抗体の量が標識された抗体よりもはるかに多い場合、結合の70%よりも多くが、この特異的抗体により交換されるが、非特異的TM1.1 scFvは、L32結合に対し有意な作用を有さなかった。抗-CD162がL32の交換に最大の能力を有する(89%ほどまで)一方で、Y1及びL32 scFv抗体は、異なる程度にL32結合を交換した。示された結果及び他のものを基に、L32及びY1結合の両方に競合するためには、Y1よりもより少ないL32が必要であり、このことは、L32は同じ部位へのY1の結合よりもより大きい結合能を有することを示唆している。従ってこれらの結果は更に、L32結合の特異性、及びL32エピトープとY1及び抗-CD162抗体により認識されたものとの間の実質的関係を裏付けている。

10

【0185】

【表6】

表6.

インヒビター濃度	L32ビオチン濃度		
	0.5 μ g L32-B	2 μ g L32-B	5 μ g L32-B
なし	22.65		
50 μ g TM1.1	21.6	28.3	38.32
50 μ g Y1	6.36	12.99	21.99
50 μ g L32	5.66	9.34	22.58
5 μ g 抗-CD162	4.06	3.95	4.4

20

【0186】

L32、Y1及び抗-CD162抗体の間の競合は、KG-1細胞への標識された抗-CD162抗体結合の交換の程度を試験することにより、更に評価した。L32及びY1の両scFv抗体(50 μ g)は、KG-1細胞を標識する抗-CD162(5 μ g)の幾何平均を約82%低下することが分かった。従って、これらの抗体のエピトープは、明らかに密に関連している。

30

【0187】

実施例6

本実施例は、ELISAによる、GPIbの蛋白質分解性断片であるグリコカリシン(GC)へのL32 scFv抗体結合を明らかにしている。

【0188】

GCは、Michalsonにより説明されたように、新鮮なヒト血小板から精製した(Blood、67: 19-26 (1986))。アッセイにおいて使用する前に、GPIbの同一性を、下記の2種の異なる市販のモノクローナル抗体調製物を使用するEIAにより確認した；Pharmigen社(サンディエゴ、CA)から購入した第一の抗体(クローンH1P1)は、リストセチンが誘導した血小板凝集を阻害し、及びSerotec社(ローリー、NC)から購入した第二の抗体調製物(クローンPM6/40)は、血小板凝集を阻害しない。

40

【0189】

L32のGCへの結合の定量分析は、ELISAにより決定した。1 μ g/ml(PBSx1)に希釈したGCを使用し、Maxisorpプレートウェルを、4 で一晩インキュベーションすることによりコートした。過剰なGCを除去後、これらのプレートを、PBSTM(2%ミルク及び0.05% Tweenを含むリン酸緩衝生理食塩水溶液)により室温で1時間ブロックした。多量のPBSTMによる洗浄後、これらのプレートを、PBSTM中に希釈した様々な濃度のscFvと共にインキュベシ

50

ョンした。引き続き、これらのプレートを、1:250希釈した抗-scFv、又は1:50の抗-VL、又は1:100の抗-mycと共にインキュベーションし、引き続きPBSTM中に1:25,000希釈した抗-ウサギHRP(Jackson社)又は1:25,000の抗-マウスHRP(比較として)のいずれかと共にインキュベーションした。この反応は、TMBにより顕在化し(develop)、及び0.5M H₂SO₄の添加により停止した。これらのプレートを、ELISAリーダーを用い450nmで読みとり、及び二つ組の試料の結果を平均化し、平均値からバックグラウンド(一次抗体を伴わない染色)OD値を減算することにより、ELISA単位値を計算した。結果を図6に示し、これはGCへのY1結合は、L32のそれよりも約3~4倍大きいことを示した。

【0190】

実施例7

本実施例は、ウェスタンブロット分析による、様々なヒト由来の給源からの蛋白質に結合するL32 scFv抗体を明らかにしている。

【0191】

細胞抽出物(溶解液)を調製した。細胞(2x10⁶個)を収集し、微量遠心機により遠心した(1300rpm、4、5分間)。このペレットを、0.5~1ml PBSで洗浄し、穏やかに攪拌し、及びこの混合物を前述のように遠心した。0.5~1ml PBSによる洗浄を反復し、及びペレット化した細胞を、溶解緩衝液中に懸濁した(200µl/20x10⁶個細胞ペレット)。使用した溶解緩衝液は、50mM Tris(pH7.4)、1mM PMSF、1% NP-40、及び1mM EDTAであるが、他の適当な溶解緩衝液を使用してもよい。この懸濁液を、氷上で約60分間インキュベーションし、その後遠心した(3000rpm、4、5分間)。次に上清を収集し、アリコートに分けた。

【0192】

膜蛋白質の粗膜画分及び抽出物も調製した。ホモジナイゼーション緩衝液の20容量を、1容量のパッケージした細胞に添加した。このホモジナイゼーション緩衝液は、2%(w/v)Tween20、1mM MgSO₄、2mM CaCl₂、150mM NaCl、及び25mM Tris-HCl(pH7.4)を含んだ。次のプロテアーゼインヒビターも添加した:1mM PMSF、5µg/mlロイペプチン、及び5µg/mlアプロトニン。これらの細胞を、回転式Teflon内筒(Ultra-Torex社)を付属したPotter-Elvehjemホモジナイザーを用い、速さ3から5ストロークでホモジナイズした。この試料を、ホモジナイゼーション期間は冷やし続け、その後氷浴中で1時間攪拌した。ホモジナイザー中の試料に、数回追加のストロークを施し、3000gで30分間、4で遠心した。上清を収集し、45000g(19000rpmローターss-34)で1時間4で遠心した。45000g遠心分離の上清は、廃棄した。50mM Tris(7.4)、1mM EDTA、1% NP-40及びプロテアーゼインヒビターの溶液を、このペレットに添加し、溶解したペレットを、氷上に1時間静置した。

【0193】

血漿蛋白質試料を、健常者の血液バンクからのプールした血漿のPBSによる1:10(v/v)希釈後に調製した。この希釈した溶液を、0.45µm膜を通してろ過し、及びアリコートを分析時まで凍結貯蔵した(-20)。その後試料を、10% SDS-PAGE上を、Sigma Z37 503-9泳動装置において、140~160Vで3.5時間流した。電気泳動した試料を、ニトロセルロース膜上に、Tris-グリシン緩衝液(20% MeOH、192mMグリシン、25mM TRIS、pH8.3)中で、室温20Vで一晩かけて移した。

【0194】

このニトロセルロース膜を、5% スキムミルクを用い室温で1時間かけてブロックした。その後この膜を、PBS中の0.05% Tween 20で各々、5分間かけて室温で3回洗浄した。この膜を、PBSを溶媒とする2% スキムミルク中の5µg/ml Y1-ビオチン、L32-ビオチン、又はT M1.1ビオチンと共に、室温で1時間インキュベーションした。次にこの膜を、コールドルーム(約4~約10)において、PBSを溶媒とする冷0.05% Tween 20で各々5分間、3回洗浄した。次にこの膜を、コールドルームにおいて、2% スキムミルク、0.05% Tweenを溶媒とするSAV-HRP(ストレプトアビジン-HRP)の1:1000希釈物(最終濃度1µg/ml)と共にインキュベーションした。この希釈は室温(約25)で実行し、その後希釈したSAV-HRPを、使用前の10~15分間氷上で冷却した。このインキュベーションは、穏やかに攪拌しながら1時間実施した。

10

20

30

40

50

【0195】

SAV-HRPとのインキュベーション後、この膜を前述のように洗浄した。その後膜を、Super Signal混合物(Pierce社)と共に商業的プロトコールに指示されたように5分間インキュベーションし、その後過剰な溶液を乾燥した。この膜は、X-線フィルム(Fuji社)に曝露し、このフィルムを現像した。これらの試験の結果(図7)は、L32は、分子量約105kDのPSGL-1を伴う、白血病細胞上の蛋白質に結合することを示している。加えて、L32及びY1の両方が、GC及びKG-1細胞の同じバンドと反応する。しかし、血漿蛋白質へのL32結合は、Y1よりも遙かに低く、及びRaji細胞抽出物は、この>100kDaバンドに対し陰性であった。

【0196】

実施例8

本実施例は、ELISAにより、硫酸化された及び硫酸化されないペプチドのL32及びY1への競合的結合を明らかにしている。

【0197】

恐らくエピトープ(GPIbのアミノ酸268-285及び成熟PSGL-1の1-17)を基にした硫酸化された及び硫酸化されない合成ペプチドを調製し、及びL32 scFv抗体(ELISA)の結合特異性を評価するために使用した。硫酸化された及び硫酸化されないペプチド(1 μ M)を、ELISA分析に適したマイクロタイタープレートに結合し、及び未結合のペプチドを完全に洗浄した後、非特異的結合部位をブロックした。これらのプレートを、指定された濃度のscFv抗体と共に、1時間室温でインキュベーションした(図8参照)。結合したscFvを、ポリクローナルウサギ抗-V_L抗体、引き続きホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)抗-ウサギ抗血清を用いて検出した。これらの試料を、基質TMBを用いて顕在化させ、及び約10分後に、0.5M H₂SO₄によりこのペルオキシダーゼ反応を停止した。これらのペプチドへのL32の結合を、Y1及びTM1.1(陰性対照として)scFv抗体と比較した。バックグラウンド染色(一次抗体非存在下)を、各値から減算し、棒グラフに示した値を得た。結合、及びそれらの本質的構造特性について評価したペプチドを、表7に示した。

【0198】

10

20

【表7】

表7.

ペプチド給源	記号表示	配列	AA	MW	硫酸化
フィブリノーゲン γ プライム	A	VRPEHPAETEYESLYPEDDL	20	2389	—
フィブリノーゲン γ プライム	B	VRPEHPAETEY*ESLY*PEDDL	20	2549	硫酸化
PSGL-1-n-末端	C	QATEYEYLDYDFLPETE	17	2126	—
PSGL-1-n-末端	D	QATEY*EYLDYDFLPETE	17	2206	硫酸化
PSGL-1-n-末端	E	QATEY*EY*LDYDFLPETE	17	2286	硫酸化
PSGL-1-n-末端	F	QATEY*EYLDY*DFLPETE	17	2286	硫酸化
PSGL-1-n-末端	G	QATEYEY*LDYDFLPETE	17	2286	硫酸化
PSGL-1-n-末端	H	QATEYEY*LDY*DFLPETE	17	2286	硫酸化
PSGL-1-n-末端	I	QATEYEYLDY*DFLPETE	17	2286	硫酸化
PSGL-1-n-末端	J	QATEY*EY*LDY*DFLPETE	17	2286	硫酸化
GPIb α	K, P1	GDEGTDLYDYYPEEDTE	18	2126	—
GPIb α	L, P1S	GDEGTDLY*DY*Y*PEEDTE	18	2366	硫酸化
GPIb α	P14S	GDEGTDLYDY*Y*PEEDTE	18	1732	硫酸化
GPIb α	P28S	TDLY*DYYPEEDTE	13	1732	硫酸化
CCR5	M	MDYQVSSPIYDINYYTSE	19	2189	—
CCR5	N	MDY*QVSSPIY*DINY*YTSE	18	2429	硫酸化

Y*は、硫酸化されたチロシンを意味する。

【0199】

有意な用量-依存型のL32 scFv抗体結合が、ペプチドF、H、I及びJ、すなわち第三のチロシン残基が硫酸化されたPSGL-1-関連ペプチド、並びにL及びP28S、すなわち第一のチロシン残基が硫酸化されたGPIb-関連ペプチドで得られた(図8)。JへのL32 scFv抗体結合は、Iへのその結合に非常に似ている。GPIb-関連したL(P1S)ペプチドへの結合は有意であるが、しかしこれは、PSGL-1関連ペプチドで得られたものに匹敵するほど低い。Y1もL32もいずれも、硫酸化されたPSGL-1-関連したペプチドG及びD(第三残基の硫酸化を欠いている)への有意な結合は認められなかった。更にY1もL32もいずれも、フィブリノーゲン鎖に関連した硫酸化された(又は硫酸化されない)ペプチドには結合しなかった。いずれのscFv抗体も、その中のチロシンが硫酸化されていないペプチドには結合せず、このことは、硫酸化は結合の必須要件であることを示している。更に、GPIb-関連ペプチドP28Sに関するデータは、第一のチロシンの硫酸化は、GPIbへの結合について重要であることを示唆しているのに対し、PSGL-1ペプチドI及びJのEとの比較に関するデータは、第三のチロシンの硫酸化は、PSGL-1への結合にとって重要であることを示唆している。Y1及びL32ディスプレイは、硫酸化されたペプチドに関する結合挙動のパターンが実質的に同じであり(このアッセイにおいて)、Y1は、各場合においてL32に関しより高い親和性結合を示す様に見える。

【0200】

前記実験結果、並びに米国特許出願第10/032,423号；第10/032,037号；第10/029,988号；第10/029,926号；第09/751,181号；及び、第60/258,948号、並びに国際出願PCT/US01/4

10

20

30

40

50

9442号及びPCT/US01/49440号に開示されたデータから、L32 scFv抗体のエピトープは、成熟PSGL-1上においてアミノ酸1と17の間に位置し、そこには、負帯電したアミノ酸のクラスターが存在することが結論づけられる。

【0201】

E-、L-及びP-セレクチンの受容体であるPSGL-1は、Y1抗体のKG-1細胞への結合が様々な市販の入手可能な抗-PSGL-1抗体の存在下で行われた競合アッセイを基に、Y1抗体のリガンドとして同定した。PSGL-1のN-末端領域は、負帯電したアミノ酸のクラスターに随伴する硫酸化されたチロシン残基を含む(米国特許出願第10/032,423号；第10/032,037号；第10/029,988号；第10/029,926号；第09/751,181号；及び、第60/258,948号、並びに国際出願PCT/US01/49442号及びPCT/US01/49440号)。

10

【0202】

Y1抗体は、血小板上のグリコカリシン分子、フィブリノーゲン- プライム、ヒト血漿の補体化合物4、及びPSGL-1分子のような、いくつかの分子に結合するが、AML又は多発性骨髄腫(MM)のいずれかの患者由来の初代白血病細胞に対するその親和性は、前述のエピトープに比べ高い。

【0203】

いずれか特定の理論に結びつけることは欲さないが、下記実施例10、16及び17に示したような、白血病細胞株及び悪性細胞に関する、L32のより大きい相対親和性(Y1のそれと比べて)との比較のように、硫酸化されたペプチドに対するY1のより大きい相対親和性(L32のそれと比べて)は、細胞上の完全な未変性の蛋白質の状況において、関連のあるペプチド配列のコンホメーション又は露出における可能性のある差のような要因に起因することがある。例えば、この実験において使用されたペプチドは、それらの未変性状態にあるので線状であり、二次及び三次構造を有さない。このような差は、非拘束性線状ペプチドである合成ペプチドにおいて明確ではない。従って、L32抗体結合の可能性のある治療的適用は、人工の合成ペプチドシステムにおいて認知できないことであり、このことは細胞システムにより示唆されている。

20

【0204】

実施例9

米国特許出願第10/032,423号；第10/032,037号；第10/029,988号；第10/029,926号；第09/751,181号；及び、第60/258,948号、並びに国際出願PCT/US01/49442号及びPCT/US01/49440号の結果は、Y1及びY17抗体は、血小板の同様の認識プロファイルを有することを明らかにしている。本実施例は、洗浄した血小板へ結合するY17 scFv抗体に対するGPIb-由来のペプチドのチロシン硫酸化及び突然変異の作用、並びにPSGL-1-由来のペプチドに対するY17結合に関するチロシン硫酸化の依存性を明らかにしている。

30

【0205】

表6から選択されたGPIb-由来のペプチド及び下記配列を有するふたつの追加のN末端-短縮したGPIb-由来のペプチドを、これらの試験において使用した：P2S - TDLY*DY*Y*PEEDTE及びP25S - TDLYDY*Y*PEEDTE。

【0206】

洗浄血小板に結合しているY17 scFv抗体は、実施例4に説明されたように、FACSにより試験した。様々なペプチドのY17の血小板への結合に対する作用は、最初のY17の指定した濃度のペプチドと一緒にインキュベーション(図9参照)、その後の血小板調製物への添加により評価した。

40

【0207】

試験したペプチド全ての、276位に硫酸化されたチロシンを含むGPIb-由来ペプチド(P28S)は、洗浄した血小板へのY17結合の最大の障害を引き起こした。アミノ酸変化を含むGPIb-由来のペプチドを調製及び試験し、Y17認識に必要なコンセンサス配列を確認した。これらの結果は、第一の硫酸化されたチロシンは、洗浄血小板へのY17結合にとって重要であることを示唆している。しかし、第二のチロシンの硫酸化は、Y17認識において明らかに役割を有さない。277及び275位の負帯電のアミノ酸残基アスパラギン酸(D)は、Y17結合

50

にとって重要である。これらの結果は、Y1について認められたものに類似していた。

【0208】

どの条件が、PSGL-1へのY17 scFv抗体結合を決定するかを証明するために、プレートに結合したPSGL-1由来のペプチドを用い、ELISA分析を行った。5及び20 µg/ml Y17 scFv抗体は、PSGL-1由来のペプチドで第三位に硫酸化されたチロシンを含むものI及び3個の硫酸化されたペプチドを含むJの両方に強力に結合した。図10は、JへのY17 scFv結合は、JへのY1結合よりもわずかに大きいこと、並びに両方のscFvは同様にIに結合したことを示している。これらのIへの結合は、それらのJへの結合よりも大きかった。Y1もY17も、G(硫酸化を伴わないPSGL1ペプチド)には有意に結合しなかった。

【0209】

まとめると、ペプチドレベルで、Y1、Y17、及びL32の全ての3種のクローンは、同様の特異性プロファイルを有した。

【0210】

実施例10

本実施例は、健常志願者及び白血病患者からの初代細胞に対するL32の結合を明らかにしている。

【0211】

細菌クローン培養、誘導プロトコール、scFv抗体断片収集、及び抗体断片精製の全ての手法は、Harrisonらの論文((1996)前掲)に従って行った。基本的には、Nissimライブラリーに存在する個別のscFv抗体、又は同じV_Lもしくはそれらの断片を含むように仮定されたいずれかのIgGもしくはそれらの断片を認識するウサギ由来のポリクローナル抗体を調製するために、2種又はそれよりも多い個別のscFvクローンのいずれかを、Nissim I抗体ファージディスプレイライブラリーから選択することができる。

【0212】

ポリクローナル抗体は、Nissim I抗体ファージディスプレイライブラリーに由来したscFv抗体クローン(Y1)由来のV_Lに対して生じた。ヒト抗体のV_LドメインをコードしているDNA断片は、下記の合成オリゴヌクレオチドプライマーにより、Y1クローンからPCR-クローン化した(同一DNA断片を、Nissim Iライブラリー(Nissimら(1994)、前掲)のいずれか他のクローンから、又は更には同じ方法を使用しヒトゲノムから得ることができる): オリゴ5'-NdeI (TTTCATATGGAGCTGACTCAGGACCCTGCT)及びオリゴ3'-E.coRI (TTTGAATTCCTATTTTGC TTTTGCGGC)。ポリメラーゼ連鎖反応による増幅(PCR条件: 94 1分間、56 2分間、72 2分間をx30回、その後65 で5分間)後、得られたDNA断片を、NdeI及びE.coRI制限酵素で消化し、並びに予め消化したプラスミドのNdeI及びE.coRI制限酵素部位へクローニングし、これをE.コリにおける組換え蛋白質の原核細胞発現のために使用したIPTG誘導発現ベクターとした。

【0213】

E.コリ細胞を、ライゲーション混合物により形質転換し、及び陽性クローンを、前記オリゴヌクレオチドプライマーを用いるPCR増幅により選択した。このプラスミドを収容している細胞を増殖し、IPTGにより発現を誘導した。IPTGによる誘導後、16時間22 で増殖した後、1Lの培養液から細菌細胞を遠心により収集した。封入体は単離し、及びグアニジン-HCl+DTEで可溶化し、TRIS-アルギニン-EDTAを含有する緩衝液中への希釈によりリフォールディングした。48時間5~10 のリフォールディング後、蛋白質を含有する溶液を透析し、20mMグリシン(pH9)中で濃縮した。蛋白質を含有する透析した溶液を、イオン交換カラムHiTrapQを用い再-精製し、及びNaCl勾配で溶離した。大きいピークを、SDS-PAGE及びゲルろ過により分析した。精製されたV_Lの少なくとも10mgを当初の1-L培養液から得た。

【0214】

次にウサギを、CFA(完全フロイントのアジュバント)の存在下でV_L(400mg)により、その後IFA(不完全フロイントのアジュバント)の存在下V_L(200mg)により、2~4週間間隔で免疫感作した。得られた抗体価は低く(1:50~1:100)、恐らくヒト及びウサギからのV_Lの間の

10

20

30

40

50

高い相同性のためであろう。

【0215】

ポリクロナル抗-scFv抗体を、免疫感作したウサギの血清から直接又はプロテインA-セファロースカラム上での精製後のいずれかで用い、FACSにより分析した細胞又はSDS-PAGEにより分離された様々な蛋白質画分(ウェスタンブロット分析)いずれかへのscFv抗体結合を検出した。

【0216】

一般に、3種のFACS分析の中のひとつを行い、選択されたクローンの特異性を試験及び確認した。「3工程染色」法は、粗抽出物又は精製された未標識のscFv、その後マウス抗-myc抗体及び最後にFITCもしくはPE-複合化された抗-マウス抗体を用いて確立した。この手法は代わりに、第二試薬としてウサギ抗-VLを、その後FITC-標識された抗-ウサギ抗体を用いて行うことができる。血液又は骨髓試料からの細胞のFACS分析は、1% BSAを含有するPBS中に懸濁された、 $5 \sim 8 \times 10^5$ 個の白血球が必要である。結合は、4で1時間行った。各工程の後、細胞を洗浄し、1% BSAを含有するPBS中に懸濁した。最終染色工程の後、赤血球の溶解が、このアッセイの最終工程であり、及びPBS中の細胞の懸濁が続き、その後FACS(Becton-Dickinson社)により測定した。最初に細胞を、myc-又はビオチン-標識された一次抗体のいずれかに曝露し、引き続きそれらを、各々、FITC-標識された抗-myc抗体又はPE-標識されたストレプトアビジンにより染色することによる「2工程染色」法により染色した細胞の分析を、3-工程法の代わりに行った。scFv-FITCによる直接細胞染色の手法は、引き続きのFACS分析のために確立した。この新規方法は、scFv-FITC標識のためのただ1回のインキュベーション工程を必要とする。加えて、正常なPBLを伴う抗-mycの反応性のために、高強度のバックグラウンドは、scFv-FITCをFACS分析に使用する場合には、非常に低かった。直接FITC scFv標識及び「3工程染色」の両方により得られた結果は、非常に類似しており、このことは、標識されたscFvの生物学的活性は、FITC標識法によっては破壊されないことを示している。従って、標識されたscFvは、標識されない抗体のものに類似した結合活性を保持し続ける。

10

20

【0217】

FACSプロトコルを行い、血液及び骨髓試料を分析した。インフォームドコンセントが得られた患者の試料を、病院から入手した。最初に、結合したscFv抗体の検出が、マウス抗-mycタグ抗体、その後の蛍光標識された抗-マウスIg抗体により検出される、3-工程染色法を用いて細胞試料を染色した。この分析において、図11に示した結果は、被験scFv(T細胞パニング由来のTM1.1、TM3.13、及びL32)は、正常な末梢血リンパ球(N-PBL)と比べ、一貫して高レベルのT-リンパ腫/白血病細胞への結合を示した。対照的に、B-CLL細胞は、scFvによる比較的lowレベルの染色を示し、これはN-PBLにより示されるものに類似していた(表8)。FACS分析に1/50のscFv希釈物が使用される場合、バックグラウンド結合のみが検出された。

30

【0218】

【表 8】

表8.

細胞型	対照	L32
T-リンパ腫/白血病	1.4	40
B-CLL	0.2	5
N-PBL**	4.9	5

*抗-myc及び抗-マウス-FITCのみを使用した。

**正常な末梢血リンパ球

10

【0219】

引き続きの試験において、患者の全血又は骨髓試料(及び健常者からの試料)を、30 μ l/試験管に調節した。5 μ lのCD33-APC(AMLについて)又はCD19-APC(B-CLLについて)又はCD38-APC(多発性骨髄腫について)を、各試験管に添加し、並びに5 μ lのCD45-PerCp及び5 μ lのscFv Y1又は対照scFv TM1.1もしくはCD162-PE(KPL1)も、各試験管に添加した。試験管を、穏やかに攪拌しながら、4℃で30分間インキュベーションした。過剰な試薬を、2ml PBSの添加により洗浄し、1200rpmで5分間遠心した。上清を廃棄した。次に1-工程アッセイにおいて、溶解工程を行った。500 μ lのBDリシン液を、ddH₂Oで1:10希釈し、300 μ lを各患者試料に添加した。これらの試料を、高速で激しく攪拌し、4℃で12分間インキュベーションし、前述のように洗浄した。上清を廃棄後、500 μ lのPBSを添加した。これらの試料を、国際基準に準じた血液試料取込み設定(acquisition setup)を用いて、FACSで測定した。2又は3工程が関与するアッセイに関して、作業緩衝液は、PBS+1%BSA+0.05%アジ化ナトリウムを含有し、インキュベーション及び洗浄は前述のように行った。

20

【0220】

健常者由来の血液試料に関して、L32の血液細胞亜集団への結合の選択性を決定するために、FACS分析を用い分析を行い、Y1選択性と比較した。結合は、標識された二次又は三次抗体による染色後に測定した。Y1及びL32の両方への結合においてドナー間に変動が存在した。従って、大半の場合を表す結果を、表9に定量的にまとめた。顆粒球、リンパ球、及び単球へのL32 scFv結合は一般に、これらの細胞へのY1 scFv結合よりも大きかった。対照的に、血小板へのL32 scFv結合は、バックグラウンドに類似しており、一般にY1 scFvによるものよりも少なかった。これらの結果は更に、実施例6に示されたこと(図2参照)により裏付けられており、これはPRPにおける血小板凝集及び洗浄血小板の凝集反応への少ない作用を説明している。

30

【0221】

【表 9】

表9.

細胞型	陰性対照と比べた結合	
	Y1	L32
リンパ球	バックグラウンド-低	低+/-
単球	+/-低	中+/**
顆粒球	低-中+	中-高**
血小板	+/-低	バックグラウンド

10

【0222】

スケール化は、下記の判定基準を基にした(これは、絶対スケールではない - 2xの比は、実際には、数倍より高い結合と解釈することができる。):

- バックグラウンド染色

+/- 陰性scFvと被験scFvの間の平均流れ比、最大2x

+ 陰性scFvと被験scFvの間の平均流れ比、2x - 3x

** 陰性scFvと被験scFvの間の平均流れ比、4x - 6x

*** 陰性scFvと被験scFvの間の平均流れ比、6x - 8x

**** 陰性scFvと被験scFvの間の平均流れ比、> 10x

20

【0223】

この表の全ての結果は、シグナル増幅に関連した2-又は3-工程染色法を用いて得られたことに注目することは重要である。加えて、1工程よりも多い染色工程が使用される場合、血小板は活性化され、及び方法に関連した作用から得られるシグナルは増幅される。このような手法において、標識された抗体は、活性化された血小板に露出されたGPIb及び新規に露出されたPSGL-1の両方に結合する。

【0224】

癌患者からの血液/骨髄試料について、L32結合の選択性を決定するために、FACS分析を用い、Y1選択性と比較して分析を行った。結合は、標識された二次抗体による結合の結果として測定した。表10に示したように、これらの結果は、L32は一般に、Y1が結合するよりもより大きい程度に罹患した細胞に結合することを示している。付随して、顆粒球、リンパ球、及び単球へのL32結合は、Y1のそれよりも大きかった。この増加した結合は、正常細胞との低下した相互作用を示唆し、これは治療のための抗体用量がより少ないことを意味する。

30

【0225】

【表 10】

表10.

疾患	細胞型	陰性対照と比べた結合	
		Y1	L32
AML (4試料)	罹患	+から+++の範囲	++++
	リンパ球	+から++の範囲	+++
	顆粒球	+/-	++
MM (2試料)	罹患	+++	++++
	リンパ球	++	+++
	単球	++	+++
	顆粒球	++	+++
B-白血病 (2試料)	罹患	-から++の範囲	+
	リンパ球	+から++の範囲	+++
	単球	+++	++++
	顆粒球	++	++++

10

20

【0226】

市販のCD162-特異的モノクローナル抗体、抗-ヒトPSGL1は、AML、ヘアリーセル白血病、及びB-細胞性悪性疾患(例えば、Pre-B-ALL、B-ALL、B-CLL、B-PLL、及び多発性骨髄腫)を含む、全ての被験試料において、L32の結合に取って代わったことに注意しなければならない。

【0227】

完全なIgG、二重特異性抗体、三重特異性抗体及びFab断片は全て、scFv抗体の特異性を共有し、及び抗-CD162は各抗体型の結合に取って代わった。

【0228】

実施例11

本実施例は、L32の、様々な種の動物に由来した初代細胞への結合を表している。

【0229】

L32の血液細胞亜集団への結合の選択性を、様々な種の動物から得た血液試料について評価した。全血試料を、L32又はY1のいずれかのscFvで、引き続きPE-標識されたウサギ抗-scFvで染色した(2-工程染色)。これらの試料は、FACS分析により引き続き分析した。これらの結果を表11に表し、これは種間には、両抗体による結合の変動が存在することを示している。それにもかかわらず、Y1は一般に、顆粒球を、L32よりもより大きい程度に染色し、及びY1は一般に、血小板を染色することが認められるのに対し、L32はこれらを染色せず、このことは実際にY1は、L32よりも広い特異性を有することを示している。

40

【0230】

【表 1 1】

表11.

種	細胞集団	FACS分析による結合	
		Y1	L32
マウス (Balb/c)	顆粒球	+/-	-
	血小板	++	-
	他の細胞集団	-	-
ラット	全ての細胞集団	-	-
ウサギ	顆粒球	+	+
	他の細胞集団	-	-
モルモット	リンパ球	+	-
	単球	++	-
	顆粒球	++	-
	血小板	+	-
イヌ	リンパ球	-	-
	単球	++	+/-
	顆粒球	+	-
	血小板	+++	-

10

20

【 0 2 3 1 】

実施例 12

本実施例は、ヒト起源の悪性細胞を有するマウスへのL32の投与の作用を明らかにしている。

【 0 2 3 2 】

SCIDマウス(Jackson社)を、100mg/kg CTXで前処理し、Molt-4(T白血病)細胞を、CTX注射の5日後に尾静脈から静脈内(i.v.)接種した。マウスは無作為に治療群(1群6匹)に分け、これらは5日後、3週間はPBS、Molt-4、Y1で、及び2週間はL32で処置した。Molt-4群のマウスは、処置しなかった。33日目に、マウスを屠殺し、それらの肝臓を秤量した。図12は、Molt-4増殖(growth)を伴うマウスの肝臓質量が2倍であり、及び組織学的に測定した腫瘍有病率が~65%であったことを示している。Y1又はL32 scFv抗体のいずれかによる処置は、実質的に処置されたマウスにおける腫瘍負荷を低下した。

30

【 0 2 3 3 】

実施例 13

本実施例は、L32二重特異性抗体及び三重特異性抗体の構築、発現及び精製を明らかにしている。

40

【 0 2 3 4 】

当初のL32をコードしているベクター-pHEN-L32は、 V_L 及び V_H 両領域について、個別に、PCRを用い増幅した。センスオリゴヌクレオチド及びアンチセンスオリゴヌクレオチドを、 V_L PCR反応に使用した。予想されるサイズを有するcDNA生成物を精製し、配列決定し、及び制限酵素で消化した。同じ手法を用い、 V_H 領域を増幅した。 V_H PCR産物は、制限酵素で消化した。予め消化したpHENベクターへのトリプルライゲーション法を用いた。最終のベクターは、pTria-L32と称した。E.コリ形質転換後、更なる分析のために、いくつかのクローンを採取し、これはDNA配列決定、蛋白質発現及び細菌の周辺腔からの抽出を含んだ。還元条件下でのSDS-PAGE及びウェスタンブロット分析を行い、L32三重特異性抗体のサイズを確認した。

50

【0235】

pTria-L32ベクターは、制限酵素により線状化し、合成の相補的2本鎖オリゴヌクレオチドを、プレアニーリングし、及びL32-重鎖とL32-軽鎖の間の制限部位にライゲーションした。この新規ベクターは、pDia-L32と称した。三重特異性抗体について説明したように、DNA配列及び蛋白質発現を確認した。

【0236】

E.コリにおける発現は、本質的にscFv L32について説明されたものである。しかし、形質転換されたE.コリ細胞の周辺細胞質からのL32二重特異性抗体及び三重特異性抗体の精製は異なった。scFv L32モノマー型は、プロテイン-Aセファロースビーズのアフィニティカラム上で精製することができる。しかしL32の多量体型は、この手法による精製は無効であり、従って細菌から抽出された周辺細胞質性蛋白質は、60%硫酸アンモニウムにより一晩沈殿させ、H₂O中に懸濁し、及び0.1xPBSで予め平衡化したセファクリル-200(Pharmacia社)サイズ排除カラム上に負荷した。画分を収集し、及びHPLCにより分析し、二量体型又は三量体型のいずれかを含有する分離画分を、FITC標識及びFACS分析のために収集した。

10

【0237】

実施例14

本実施例は、L32-cys-kak(システイン二量体)の生成を示している。

【0238】

1Lの pL-L32-cys-kak細菌培養液を、2~3時間42℃で誘導した。この培養液を、5000RPMで30分間遠心し、そのペレットを、TE (50mM Tris-HCl(pH7.4)、20mM EDTA)180ml中に懸濁し、リゾチーム8ml(5mg/mlストックより)を添加し、1時間インキュベーションした。20mlの5M NaCl及び25mlの25% Tritonを添加し、更に1時間インキュベーションした。この混合物を、13000RPMで60分間、4℃で遠心し、上清を廃棄した。ペレットを、組織ミンサー(又はホモジナイザー)を使い、TE中に懸濁した。このプロセスを、封入体(ペレット)の色が灰色/明褐色になるまで、3~4回繰り返した。

20

【0239】

これらの封入体を、6Mグアニジン-HCl、0.1M Tris(pH7.4)、2mM EDTA中で可溶化した(可溶化緩衝液10ml中に1.5gの封入体は~10mg/ml可溶性蛋白質を提供した)。これを、少なくとも4時間インキュベーションした。蛋白質濃度を測定し、濃度を10mg/mlにした。DTEを、最終濃度65mMになるよう添加し、一晩室温でインキュベーションした。0.5Mアルギニン、0.1M Tris(pH8)、2mM EDTA、0.9mM GSSGを含有する溶液へ、蛋白質10ml(1滴ずつ)を希釈することにより、リフォールディングを開始した。このリフォールディング溶液は、48時間~10℃でインキュベーションした。この蛋白質を含有するリフォールディング溶液は、25mMリン酸緩衝液(pH6)、100mM尿素を含有する緩衝液中で透析し、500mlに濃縮した。濃縮/透析した溶液を、SP-セファロースカラムに結合させ、及びこの蛋白質をNaCl勾配(最大1M)により溶離した。

30

【0240】

実施例15

完全L32 IgG抗体並びにFab₁及びF(ab')₂断片の作成を、Y1 IgGについて行ったように、以下のように行った。

40

【0241】

CHO⁻細胞を、10%ウシ胎仔血清及び40µg/mlゲンタマイシンを補充したF-12培地中で、5%CO₂大気下で37℃で培養した。トランスフェクションの前日に、1-1.5-1x10⁶個細胞を90mm皿上に播種した。この培養物は、L32抗体の軽鎖及び重鎖をコードしているDNAの10µgにより、同時-トランスフェクションした。トランスフェクションは、FuGene(Roche社)トランスフェクション試薬技法で行った。非選択増殖培地で2日間増殖した後、細胞を、550µg/mlネオマイシン及び3µg/mlプロマイシンを含有するF12培地において、10~12日間培養した。これらの細胞を、トリプシン処理し、Costar 96-ウェルプラスチックプレートにおける、0.5細胞/ウェルの限界希釈によりクローニングした。個々のコロニーを採取し、

50

6ウェル皿で増殖し、更に選択するためにフラスコに移した(発現レベル及び増殖培地への抗体分泌の決定のため)。

【0242】

CHO⁻細胞は、10%ウシ胎仔血清及び40 μ g/mlゲンタマイシンを補充したF-12培地において、5%CO₂大気下で37^oで培養した。トランスフェクションの前日に、0.8-1x10⁶個細胞を90mm皿上に播種した。この培養物は、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター下でクローニングしたL32抗体の軽鎖及び重鎖、並びにsv-40プロモーター下のdhfr遺伝子をコードしているDNAの10 μ gによりトランスフェクションした。トランスフェクションは、FuGene(Roche社)トランスフェクション試薬技法で行った。非選択増殖培地で2日間増殖した後、細胞を、100nM~5 μ Mメトトレキセート(MTX)を含有する培地において培養し、増大したレベルの完全L32抗体を発現しているクローンを選択するために、ウシ胎仔血清を透析した(限界希釈後)。

10

【0243】

サンドイッチELISAアッセイが、トランスフェクションされたCHO細胞の上清に分泌されている抗体濃度を決定するために確立されている。抗体濃度を定量するために、下記試薬を使用した:コートされた抗体としてモノクローナル抗ヒトIgG1(Fc)(Sigma社)、検出剤としてヤギ抗-ヒトIgG(鎖特異的)ビオチン複合体(Sigma社)、及び標準として精製されたヒトIgG1、(Sigma社)。

【0244】

細胞を、10%ウシ胎仔血清、ネオマイシン及びプロマイシンを補充したF-12培地(先に示した)中で、最終濃度が1個のボトルにつき1-2x10⁸個細胞となるまで回転ボトルにおいて増殖した。抗体産生のために、細胞を、2%ウシ胎仔血清を含み更に2日間追加した以外は同じ培地で培養した。分泌された抗体を、プロテインG-セファロースカラム(Pharmacia社)及びイオン交換カラム-Qセファロース(Pharmacia社)上で精製した。20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)中で結合し、0.1Mグリシン緩衝液(pH2.5~3.0)中で溶離した。精製した抗体の定量は、UV吸光度及びELISAにより決定し、その純度はSDS-PAGE及びHPLCにより分析した。

20

【0245】

L32 IgGのFab₁、及びF(ab')₂への断片化。最初に、固定されたFicin(Pierce社)を用い、一価及び二価の抗体断片を調製した。Ficin切断法は、1mMシステインの存在下で、F(ab')₂断片を作成する。同様に、消化緩衝液中のシステインアクチベーターの濃度を10mMに増大することにより、Fab断片を、当初のIgGから作成することができる。消化後、これらの断片を、固定したプロテインAカラム上で精製した。F(ab')₂及びFab₁断片は、微量濃縮装置を用い、10,000又は30,000ダルトンのいずれかの分子量カットオフ値で濃縮した。蛋白質回収率は、280nmでの吸光度を用い決定した。断片の純度は、ゲル電気泳動を用い決定した。

30

【0246】

更に、精製されたL32抗体10mgに、消化緩衝液中の固定したパピンスラリー0.5mlを、37^oで16時間適用した。反応は、結合緩衝液1.5mlによる消化物の溶離により終結した。未消化のIgG及びFc断片からのFab₁の分離は、プロテインAカラムを用い、結合緩衝液により行った。Fab₁はフロースルー中に含まれた。280nmの吸光度を測定することにより、これらの断片を含有するピーク画分をプールし、濃縮し及びPBS(pH7.4)に対し一晚透析した。蛋白質回収率、純度及び特徴は、280nmの吸光度及びゲル電気泳動により決定した。

40

【0247】

実施例16

scFv Y1(表11)又はIgG Y1(表12)抗体のML2細胞への結合に対するscFv L32の作用を、FACS分析を使用する競合アッセイにより評価した。

【0248】

競合抗体(L32 scFv、Y1 scFv (P03)、KPL-1又は対照N06 scFv)1 μ gを、ML2細胞(0.5x10⁶個細胞/アッセイ)に添加した。30分間インキュベーションした後、Y1-PE標識されたscF

50

v又はIgGを添加し、更に30分間37℃でインキュベーションした。インキュベーション後、これらの試料をFACS緩衝液で1回洗浄し、分析した。

【0249】

結果を、分析した2回の2つ組チューブの中央値平均として、幾何平均数で示した。幾何平均値は、結合親和性の指数的及び非線形の表現である。

【0250】

表12に示した結果は、L32 scFvはscFv Y1-PEのML2細胞への結合を効果的に阻害(約80%まで)したこと、すなわちL32 scFvは、Y1 scFvに類似した様式で阻害することを示している。対照的に、無関係の陰性対照抗体scFv N06は、わずかに20%結合を阻害した。

【0251】

【表12】

10

表12.

試料	中央値	阻害率(%)
対照	5	-
KPL-1-PE	700	-
Y1-PE	240	-
Y1-PE+N06	190	20
Y1-PE+P03	48	80
Y1-PE+L32	40	83

20

【0252】

【表13】

表13.

試料	中央値			阻害率(%)		
	200ng	500ng	1000ng	200ng	500ng	1000ng
対照	3	ND	ND	-	ND	ND
Y1	12.5	ND	ND	-	ND	ND
Y1-PE+Y1	3	ND	ND	100%	ND	ND
Y1-PE+KPL-1	2	ND	ND	100%	ND	ND
Y1-PE+P03	7.5	6	5	40%	52%	60%
Y1-PE+L32	5.5	3.8	3.7	54%	79%	80%

30

40

ND=完全な阻害がより低い濃度で達成されたので実施せず

【0253】

表13に示した結果は、IgG Y1単独(最終濃度200ng)は、幾何平均12.5で細胞に結合したが、「コールド」IgG Y1又はKPL-1(市販のPSGL1に対するマウスモノクローナル抗体)のいずれか200ngは、IgG Y1結合の幾何平均を、各々、3及び2に低下したことを示している。IgG Y1のML2細胞への結合は、scFv Y1抗体により用量依存的に阻害され(競合され)、すなわち、scFv Y1抗体200ngは、IgG Y1の結合を、幾何平均7.5に低下したのに対し、1000ng

50

は幾何平均を5に低下した。IgG Y1のML2細胞への結合も、scFv L32抗体により用量依存的に阻害されるが(競合され)、scFv Y1により示される程度よりも更に大きく、すなわちscFv L32抗体200ngは、IgG Y1の結合を幾何平均5.5に低下するのに対し、1000ngはこれを幾何平均3.7に低下した。

【0254】

scFv Y1及びscFv L32は両方とも、IgG Y1のML2細胞への結合を阻害したが、同じ抗体濃度で、scFv L32により示された阻害は、scFv Y1により示されたものよりもより際だっていた。更に、試験した両IgG抗体(IgG Y1及びKPL-1)は、試験したふたつのscFv抗体と比べ、ML2細胞に対し比較的高い親和性を有し、これらはIgG Y1結合の幾何平均を、各々、幾何平均3及び2に低下した。

10

【0255】

実施例17

本実施例は、FACS分析を使用する、L32の、正常細胞(表14)及び罹病した細胞(表15)の両方を含む、血液細胞の様々な亜集団への結合を明らかにしている。

【0256】

最初に、正常なヒト骨髄(NBM)試料から単離されたCD34+前駆細胞に結合するL32 scFvの選択性を、Y1 scFvと比較し、決定するための分析を行った。結合は、標識された抗体(抗-scFv-PE)による染色後に測定した。各NBM試料は、同定アッセイにおいて、両方の抗体により試験した。

【0257】

結合を評価するために使用した判定基準は、下記のようなものである：

幾何平均(GM)10未満 - 陰性

幾何平均(GM)11～20 - 低親和性結合

幾何平均(GM)21～40 - 中親和性結合

幾何平均(GM)41以上 - 高親和性結合

【0258】

表14に示したように、試験した32種のNBM試料の中の24種(75%)は、L32にもY1にも結合しなかった。6種の試料(19%)は、L32について低親和性結合を示し、1種(3%)は、L32について中親和性結合を示し、並びに1種(3%)は、L32及びY1の両方について高親和性結合を示した。全体的に、L32及びY1のCD34+細胞に対する結合プロフィールは、類似していた。

20

30

【0259】

【表 1 4】

表14.

数	コード	P03	L32	数	コード	P03	L32
N1	105351	陰性	陰性	N17	AHSBM24	陰性	陰性
N2	AH/NBM01	陰性	13	N18	AHJBM26	陰性	陰性
N3	AH/NBM03	陰性	陰性	N19	AHSBM27	9.6	22
N4	AH/NBM04	陰性	陰性	N20	AHSBM28	陰性	17
N5	KBM33	陰性	14	N21	AHJBM31	26	28
N6	AH/NBM08	陰性	陰性	N22	AHJBM36	陰性	陰性
N7	AH/NBM09	10	13	N23	AHJBM37	陰性	陰性
N8	AH/NBM10	10	14	N24	AHJBM38	陰性	陰性
N9	AH/NBM11	陰性	陰性	N25	AHJBM39	陰性	陰性
N10	AH/NBM12	陰性	陰性	N26	AHJBM40	陰性	陰性
N11	AH/NBM13	陰性	陰性	N27	AHJBM41	陰性	陰性
N12	105377	陰性	陰性	N28	AHJBM42	陰性	陰性
N13	AH/NBM14	陰性	陰性	N29	AHJBM43	陰性	陰性
N14	AH/NBM20	9	16	N30	AHJBM44	陰性	陰性
N15	AH/NBM22	陰性	陰性	N31	AHJBM45	陰性	陰性
N16	AH/NBM23	陰性	陰性	N32	102546	陰性	陰性

表中の数は、試料の幾何平均を表している。

【 0 2 6 0 】

加えて、患者の血液試料から単離されたヒト初代白血病細胞 (AML、MM、B-CLL、及びB-ALL) に対する L32 scFv 及び Y1 scFv (P03) の結合の比較的 FACS 分析を行った。L32 の結合を、同じアッセイにおいて、同じ試料中の Y1 のそれと比較した。この結合判定基準は、直前に示したものである。

【 0 2 6 1 】

表 15 は、試験した全ての患者試料から得られたデータを示し、及び表 16 は、AML 及び B-CLL 試料中の L32 及び Y1 親和性に関する親和性データをまとめている。

【 0 2 6 2 】

10

20

30

【表 15】

表15.

	コード	型	細胞集団			
			疾患	リンパ球	単球	顆粒球
L32の白血病患者への結合						
1	42824	AML/M2	53/1000 ¹	68	-	-
2	42841	AML/M4	330	123	900 ²	280
3	42868	AML/M2	43	120	1000	345
4	42873	AML/M4	24	94	-	80
5	42874	AML/M4	陰性	73	35	陰性
6	42902	AML/M6	26	78	-	-
7	42933	AML/M5	200	18	-	-
8	42939	AML/M2	57	110	-	160
9	42946	AML/M0	陰性	98	-	-
10	R0298	AML/M0	23	260	-	-
12	R9849	AML/M4	470	260	-	340
13	KAM095	RAEB	30	83	-	240
14	R5440-7	AML/M3	200	140	-	-
15	R0376	AML/M1/M2	102	65	295	186
16	KAM096	AML/M2	36	41	-	-
17	KAM108	再発性 AML	94 ³	143	360	280
18	KAM109	AML/M5	91	18	-	38
19	KMM097	MM	100	27	-	-
20	42934	MM	650	130	560	150
21	42938	MM	550	110	360	160
22	KPC105	形質細胞腫	340	330	-	280
23	KBC098	B-CLL	37	154	-	240
24	KBC100	B-CLL	10	46	-	68
25	KBC101	B-CLL	陰性 ⁴	140	280	190
26	KBC102	B-CLL	陰性	-	-	110
27	KBC103	B-CLL	13	46	300	230
28	KBC104	B-CLL	陰性 ⁴	60	260	陰性
29	KBC105	B-CLL	70	250	-	260
30	KBC106	B-CLL	陰性	68	200	140
31	KBC107	B-CLL	17	165	420	270
32	R3093-7	B-CLL	陰性	41	490	90
33	R313-0	B-CLL	陰性	26	-	100
Y1 scFvの白血病患者への結合						
1	42824	AML/M2	陰性/87 ¹	50	-	-
2	42841	AML/M4	125	59	270 ²	126
3	42868	AML/M2	15	53	100	180
4	42873	AML/M4	12	38	-	43
5	42874	AML/M4	陰性	36	30	陰性
6	42902	AML/M6	19	24	-	-
7	42933	AML/M5	62	10	-	-
8	42939	AML/M2	8	18	-	51
9	42946	AML/M0	陰性	27	-	-
10	R0298	AML/M0	陰性	43	-	-
12	R9849	AML/M4	230	160	-	225
13	KAM095	RAEB	12	20	-	74
14	R5440-7	AML/M3	95	43	-	-
15	R0376	AML/M1/M2	29	18	100	63
16	KAM096	AML/M2	17	15	-	-
17	KAM108	再発性 AML	15 ³	20	110	120
18	KAM109	AML/M5	40	14	-	18
19	KMM097	MM	70	13	-	-
20	42934	MM	170	30	160	50
21	42938	MM	184	30	128	68
22	KPC105	形質細胞腫	117	116	-	100
23	KBC098	B-CLL	21	70	-	140
24	KBC100	B-CLL	19	17	-	27
25	KBC101	B-CLL	陰性 ⁴	29	84	47
26	KBC102	B-CLL	陰性	-	-	60
27	KBC103	B-CLL	陰性	20	86	110
28	KBC104	B-CLL	陰性 ⁴	10	84	陰性
29	KBC105	B-CLL	46	117	-	133
30	KBC106	B-CLL	陰性	41	98	65
31	KBC107	B-CLL	9.5	79	-	126
32	R3093-7	B-ALL	陰性	-	-	-
33	R313-0	B-ALL	陰性	-	-	-

1. ふたつの疾患集団
2. 疾患細胞の
3. 末梢血は、2.5%CD34+細胞を含む
4. 細胞は、CD19+/CD5-

【0263】

試験した17種のAML試料中、15種(88%)はL32の結合について陽性であり、10種の試料(59%)は高親和性結合(平均の幾何平均165)を示し、及び5種の試料(29%)は中親和性結合(平均の幾何平均28)を示した。AML試料の13種(76%)も、Y1結合について陽性であったが、

10

20

30

40

50

比較分析(表16)は、L32の平均の結合親和性は、同じ試料集団内においてY1のそれよりも常に顕著に高いことを示している。概して病期M2のAML患者試料の約50%は、L32及びY1の両方への結合を示した。病期M3又はそれ以降において、試料の約90%が両抗体に、異なる親和度で結合した(データは示さず)。

【0264】

試験した9種のB-CLL試料中、4種(44%)はL32の結合について陽性であり、1種の試料(11%)は高親和性結合(幾何平均70)を示し、1種の試料(11%)は中親和性結合(幾何平均37)を示し、及び2種の試料(22%)は低親和性結合(平均の幾何平均15)を示した。試験したB-CLL試料の3種(33%)も、Y1の結合について陽性であるが、比較分析(表16)は、L32の平均結合親和性は、同じ試料集団内においてY1のそれよりも常に顕著に高いことを示している。

10

【0265】

試験した4種のMM及び形質細胞腫試料は全て、L32及びY1の両方に高親和性を示したが、L32の親和性はY1のそれよりも大きかった(各々、平均の幾何平均410対平均の幾何平均135)。試験した2種のB-ALL試料は両方とも、L32及びY1結合について陰性であった。

【0266】

【表16】

表16.

		AML		B-CLL	
		L32	Y1	L32	Y1
高幾何平均	疾患	165	61	70	46
	リンパ球	117	50	107	42
	単球	638	145	323	58
	顆粒球	239	110	169	70
中幾何平均	疾患	28	12	37	21
	リンパ球	41	15	26	9
	単球	35	30	陰性	陰性
	顆粒球	陰性	陰性	陰性	陰性
低幾何平均	疾患	なし	なし	13	9
	リンパ球	18	12	陰性	陰性
	単球	陰性	陰性	陰性	陰性
	顆粒球	陰性	陰性	陰性	陰性

20

30

*数値は、表14に示した結果を基にした平均の幾何平均である。高、中、及び低親和性結合は、L32データに従い決定した。

【0267】

表15及び16の結果は明らかに、初代AML及びB-CLL血液試料の罹患した集団に加え、その他の成熟系集団(リンパ球、単球、及び顆粒球)において、L32抗体結合は常に顕著にY1よりも高いことを示している。

40

【図面の簡単な説明】

【0268】

【図1】図1は、T-ALL細胞のTM3.13 scFv染色後のFACS分析を示す。

【図2】図2は、洗浄血小板又はPRPのいずれかの対照凝集の割合としての、scFv抗体の存在下での血小板凝集のLumiaggregometer分析からの数値データを示す。

【図3】図3は、様々なscFv抗体の血小板に対する結合を比較するFACS分析を示す：図3AはAN51-PE (FSC)であり、図3BはAN51-PE(FL2-H)であり、図3Cは陰性対照であり、図3DはY

50

1-myc+であり、図3EはY1であり、図3FはL32であり、及び図3GはTM1.1である。

【図4】図4は、様々な濃度の標識されたY1抗体のKG-1細胞に対する結合と競合し及び干渉するscFv抗体(N01、Y1-myc+、及びL32)の能力を比較する、FACS分析を示す：図4Aは0ngであり、図4Bは100ngであり、図4Cは250ngであり、図4Dは500ngであり、図4Eは1000ngであり、図4Fは2500ngであり、及び図4Gは5000ngである。

【図5】図5は、標識されたY1抗体のKG-1細胞に対する結合と競合し及び干渉するscFv抗体(N01、Y1-myc+、及びL32)の能力を比較する、FACS分析からの数値データを示す。

【図6】図6は、異なる濃度のscFv抗体(TM1.1、Y1-myc+、Y1、及びL32)のグリコカリシンに対する結合の比較を提供するELISA分析の数値データを示す。

【図7】図7は、GC、血漿、並びにKG-1細胞及びRaji細胞由来の膜蛋白質へのL32及びY1 scFv抗体結合のウェスタン分析を示す。

【図8】図8は、scFv抗体(Y1-myc+、TML1.1、及びL32)のフィブリノーゲン、PSGL-1、及びGPIb-関連ペプチドに対する結合の比較を提供するELISA分析の数値データを示す。

【図9】図9は、変動濃度のGPIb由来のペプチドの存在下での、血小板のY17 scFv抗体による染色後のFACS分析の数値データを示す。この結果は、scFv抗体単独で得られた反応の幾何平均の低下率(%)で示されている。

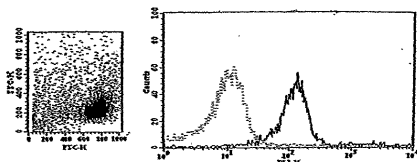
【図10】図10は、様々な異なる位置で硫酸化されたPSGL1に対するY1及びY17 scFv抗体の結合後のELISA分析からの数値データを示す。

【図11】図11は、各scFv抗体の濃度の関数としての、scFv抗体(図11AはTM1.1であり、図11BはTM1.3であり、及び図11CはL32である。)のT-ALL及び正常末梢血液細胞(N-PBL)に対する結合の比較を提供するFACS分析からの数値データを示す。

【図12】図12は、SCIDマウス-MoIt4細胞腫瘍モデルにおける、L32及びY1 scFv抗体投与の肝臓質量に対する作用(図12A)及び腫瘍有病率(図12B)に対する作用のin vivo試験の数値データを示す。

【図1】

FIGURE 1



【図2】

FIGURE 2

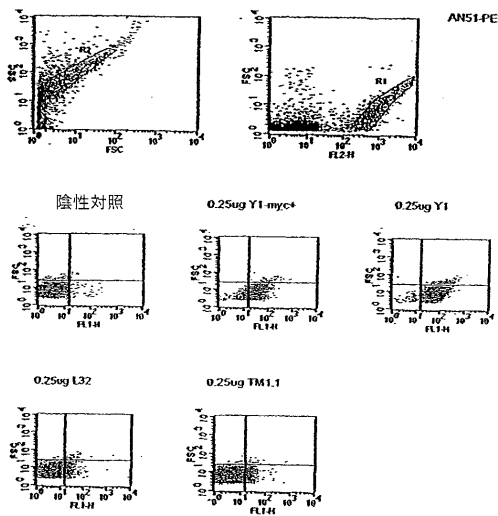
血小板凝集(PRP)-リステチン活性化に対するY1二量体の影響

日付	クローン	濃度ug/ml	凝集	
			前	後
6.2.02	洗浄血小板	30	3	70
10.3.02	二量体のsKAK	25	4.5	30
11.3.02	二量体のsKAK	25	8	61
13.3.02	二量体のsKAK	25	14	100
二量体プール-024-118 平均n=3 63%				
6.2.02	洗浄血小板	7.5	2.5	17
10.3.02	二量体のsKAK	10	4	27
11.3.02	二量体のsKAK	10	6	64
13.3.02	二量体のsKAK	10	9	61
二量体プール-024-118 平均n=3 59%				
6.2.02	洗浄血小板	7.5	2.5	17
10.3.02	二量体のsKAK	4	2	13
13.3.02	二量体のsKAK	4	2	13
二量体プール-024-118 平均n=2 13%				
6.2.02	洗浄血小板	0.5	1	22
10.3.02	二量体のsKAK	1	0	0
11.3.02	二量体のsKAK	1	0	0
13.3.02	二量体のsKAK	1	0	0
二量体プール-024-118 平均n=3 0%				

二量体プール-024-118

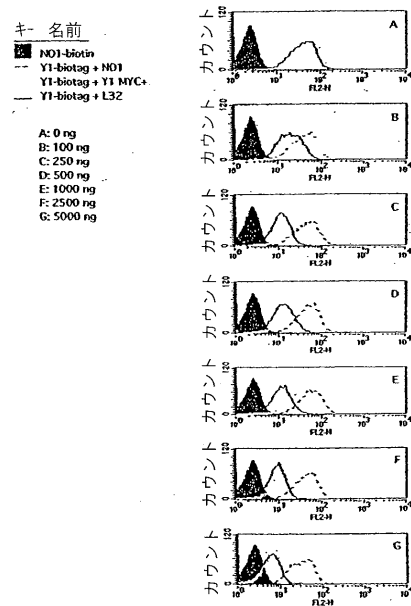
【 図 3 】

FIGURE 3



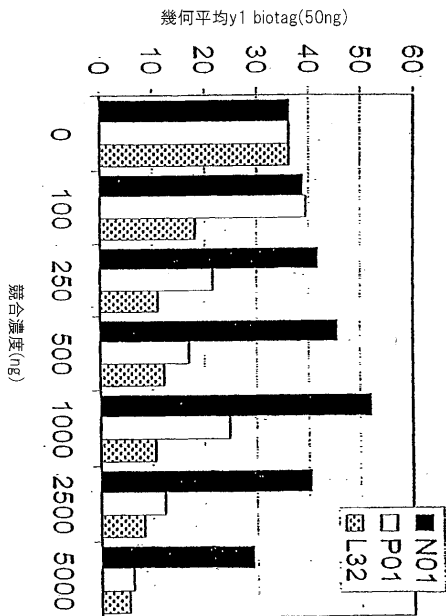
【 図 4 】

FIGURE 4



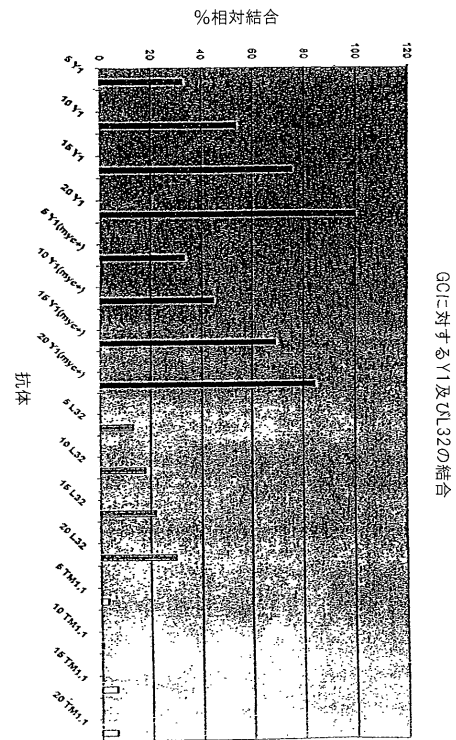
【 図 5 】

FIGURE 5



【 図 6 】

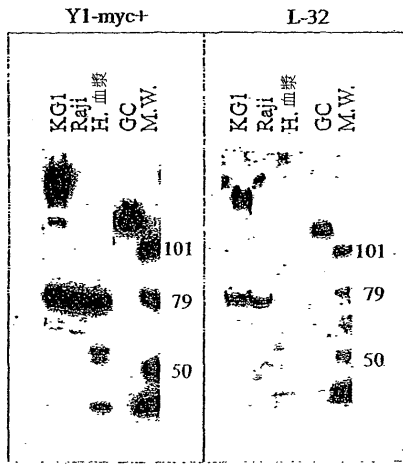
FIGURE 6



QCに対するY1及L32の結合

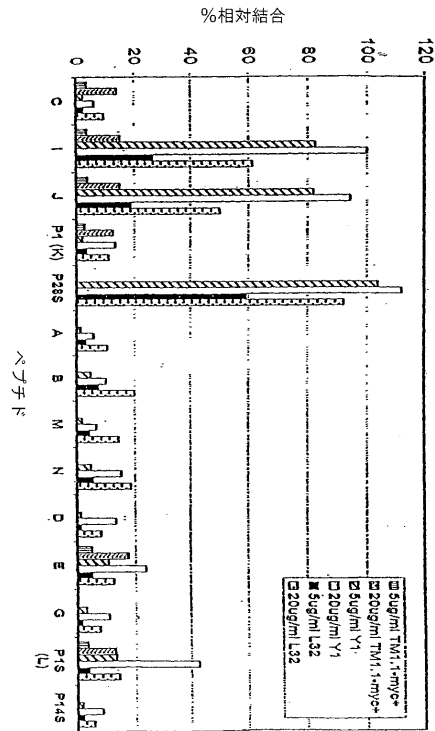
【 図 7 】

FIGURE 7



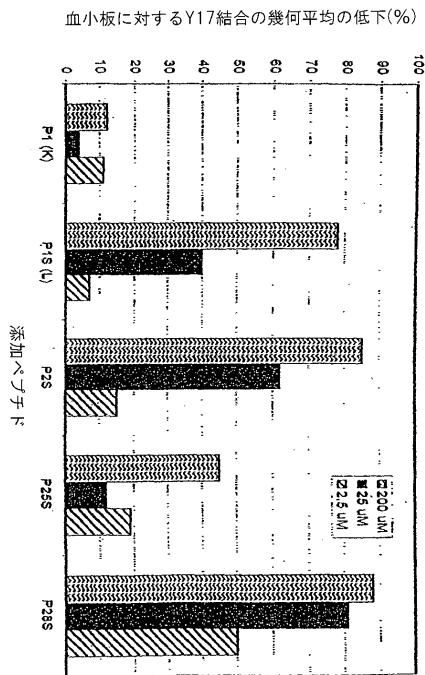
【 図 8 】

FIGURE 8



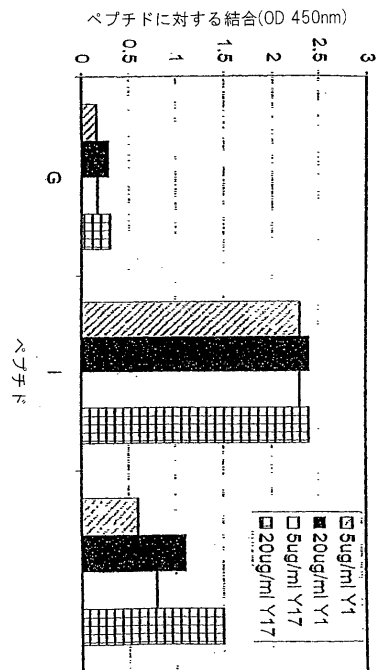
【 図 9 】

FIGURE 9

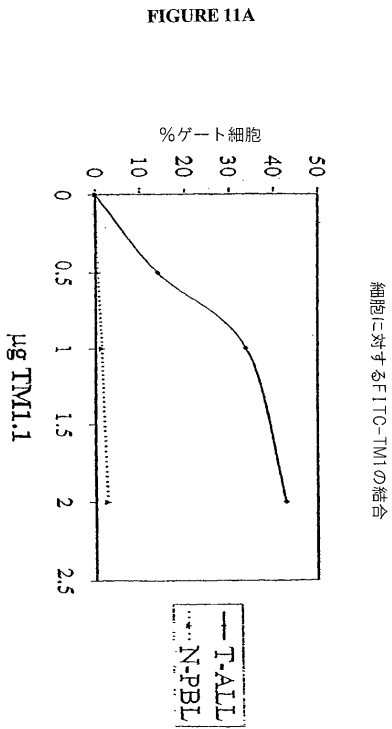


【 図 10 】

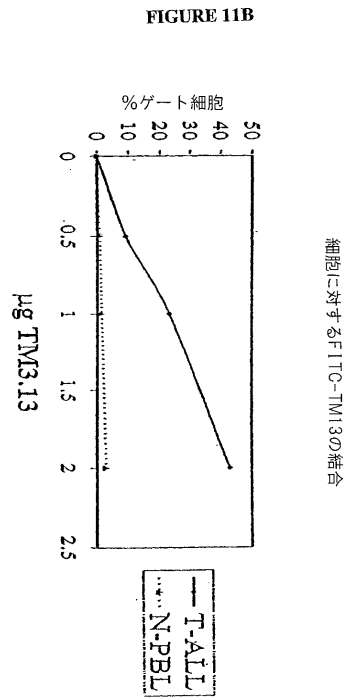
FIGURE 10



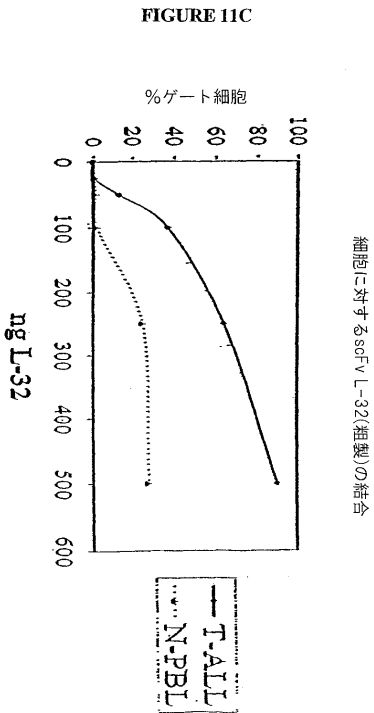
【 図 1 1 A 】



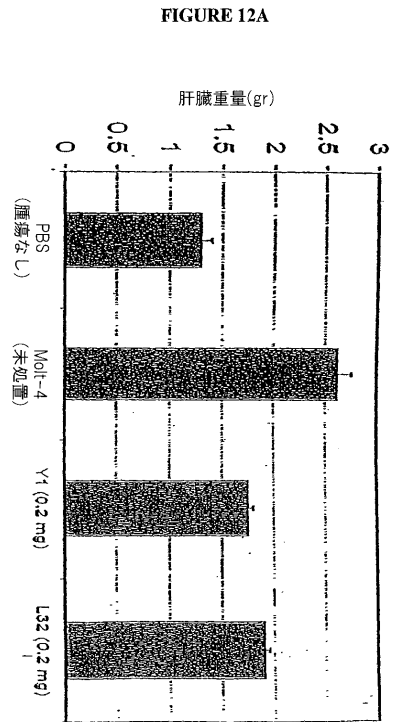
【 図 1 1 B 】



【 図 1 1 C 】

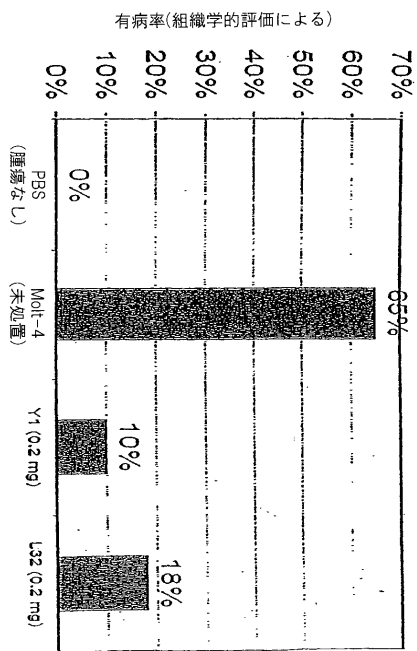


【 図 1 2 A 】



【 図 1 2 B 】

FIGURE 12B



【 配列表 】

[2005536199000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/20602
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : A61K 39/395; G01N 33/574; C12N 5/06, 5/16, 15/09, 15/13; C12P 21/00; C07K 16/00; C07H 21/04 US CL : 424/135.1, 152.1, 155.1; 435/7.23, 326, 344, 320.1; 530/387.3, 530/388.8; 536/23.53 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/135.1, 152.1, 155.1; 435/7.23, 326, 344, 320.1; 530/387.3, 530/388.8; 536/23.53		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FRENETTE, P.S., P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 (PSGL-1) Is Expressed on Platelets and Can Mediate Platelet-Endothelial Interactions In Vivo, J. Exp. Med. 17 April 2000, Vol. 191, No. 8, pages 1413-1422.	1-85
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 13 December 2003 (13.12.2003)		Date of mailing of the international search report 13 JAN 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Laurie Scheiner <i>L. Roberts for</i> Telephone No. (571) 272-1600

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 35/04	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 0 7 K 7/00	C 0 7 K 7/00	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 49/02	Z

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

T E F L O N

(74) 代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74) 代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72) 発明者 レバノン, アビグドー

イスラエル国, レホボト, モリバー ストリート 8

(72) 発明者 ベン - レビー, レイチェル

イスラエル国, 26 ベネイ レーム, モバイル ポスト イブタッチ

(72) 発明者 ブラクシン, ダニエル

イスラエル国, レホボト, パルディ 12

(72) 発明者 スザントン, エスター

イスラエル国, レホボト, スミランスキー 16

(72) 発明者 ハガイ, ヨチェベド

イスラエル国, レホボト, ルピン 23

(72) 発明者 ホシュ マー - チャイム, ハジット

イスラエル国, アセレット, ハザイット 10

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA42 CA04 DA02 DA05 DA06 DA11 DA12 EA03
GA11

4B064 AG26 CA02 CA05 CA06 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA01X AA26X AA57X AA72X AA90X AA93Y AB01 BA02 CA25 CA44

CA46

4C085	AA14	AA25	AA26	CC21	CC22	DD62	EE01	GG01	HH03	KA04
	KA29	KB02	LL01	LL18						
4H045	AA11	AA20	AA30	BA10	CA40	DA75	EA28	EA50	FA72	FA74

专利名称(译)	抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2005536199A	公开(公告)日	2005-12-02
申请号	JP2004518132	申请日	2003-06-30
申请(专利权)人(译)	Sabiento制药股份有限公司雷开球德		
[标]发明人	レバノンアビグドー ベンレビーレイチエル プラクシダニエル スザントンエステル ハガイヨチエベド ホシュマーチャイムハジット		
发明人	レバノン,アビグドー ベン-レビー,レイチエル プラクシ,ダニエル スザントン,エステル ハガイ,ヨチエベド ホシュマー-チャイム,ハジット		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61K51/00 A61P9/10 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 A61P37/02 A61P43/00 C07K7/00 C07K16/18 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/13 C12P21/02		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 C07K16/2896 C07K2317/21 C07K2317/34 C07K2317/622		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.L A61K39/395.N A61P9/10 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 A61P37/02 A61P43/00.105 C07K7/00 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/53.D C12N5/00.A A61K49/02.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA42 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA03 4B024/GA11 4B064/AG26 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/AA25 4C085/AA26 4C085/CC21 4C085/CC22 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/HH03 4C085/KA04 4C085/KA29 4C085/KB02 4C085/LL01 4C085/LL18 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 西山雅也		
优先权	10/189032 2002-07-01 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了与癌细胞结合的抗体或其片段，并且在生理现象如细胞滚动和转移中是重要的。提供了这样的抗体或其片段的诊断和诊断用途的方法和预后或分期的组合物。本发明的方法和组合物可用于诊断和治疗诸如包括肿瘤生长和转移在内的癌症，白血病，自身免疫疾病和炎性疾病。

(5) Int. Cl. ⁷		F I		Z N A A		テ-マコード (参考)
C 1 2 N	15/00	C 1 2 N	15/00	Z N A A		4 B O 2 4
A 6 1 K	39/395	A 6 1 K	39/395		L	4 B O 6 4
A 6 1 K	51/00	A 6 1 K	39/395		N	4 B O 6 5
A 6 1 P	9/10	A 6 1 P	9/10			4 C O 8 5
A 6 1 P	27/02	A 6 1 P	27/02			4 H O 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	有	(全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-518132 (P2004-518132)	(71) 出願人	503232960 サビエント ファ-マシューティカルズ、 インコーポレイテッド
(86) (22) 出願日	平成15年6月30日 (2003. 6. 30)		アメリカ合衆国、ニュ-ジャーシー 08 8 1 6 イ-スト ブランズウィック、タ ワー センター ブールバード 1
(85) 翻訳文提出日	平成17年2月28日 (2005. 2. 28)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/020602	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(87) 国際公開番号	W02004/003166	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 慎
(87) 国際公開日	平成16年1月8日 (2004. 1. 8)	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 啓次
(31) 優先権主張番号	10/189, 032		
(32) 優先日	平成14年7月1日 (2002. 7. 1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く