

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4426627号
(P4426627)

(45) 発行日 平成22年3月3日(2010.3.3)

(24) 登録日 平成21年12月18日(2009.12.18)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08 Z N A
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D
G O 1 N 33/577 (2006.01)	G O 1 N 33/577 Z
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C

請求項の数 25 外国語出願 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-147491 (P2008-147491)	(73) 特許権者	504258240
(22) 出願日	平成20年6月4日(2008.6.4)		レイベン バイオテクノロジーズ, インコーポレイティド
(62) 分割の表示	特願2000-589572 (P2000-589572) の分割		アメリカ合衆国, カルフォルニア 94080, サウス サン フランシスコ, コーポレート ドライブ 1
原出願日	平成11年12月22日(1999.12.22)	(74) 代理人	100077517
(65) 公開番号	特開2009-1562 (P2009-1562A)		弁理士 石田 敬
(43) 公開日	平成21年1月8日(2009.1.8)	(74) 代理人	100092624
審査請求日	平成20年7月3日(2008.7.3)		弁理士 鶴田 準一
(31) 優先権主張番号	09/218, 539	(74) 代理人	100087871
(32) 優先日	平成10年12月22日(1998.12.22)		弁理士 福本 積
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特定の細胞型の代表的なモノクローナル抗体を産生するための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト以外の哺乳動物に対して異種である特定の細胞型を代表する細胞表面抗原に結合するモノクローナル抗体の集団を生成するためにヒト以外の哺乳動物を免疫する方法であって、当該ヒト以外の該哺乳動物に、該細胞型の複数の生存可能でかつインタクトな細胞を、アジュバントを用いないでまたはRibiアジュバントを用いて導入する工程を包含し、ここで該細胞の表面は血清を含まない、当該方法。

【請求項 2】

前記細胞が無血清培地中で培養されたものである、請求項 1 に記載の哺乳動物を免疫する方法。

【請求項 3】

前記細胞が単層の形態で増殖されたものである、請求項 1 または 2 に記載の哺乳動物を免疫する方法。

【請求項 4】

前記細胞が凝集体の形態で増殖されたものである、請求項 1 または 2 に記載の哺乳動物を免疫する方法。

【請求項 5】

前記細胞が生物学的基材または非生物学的基材上で増殖されたものである、請求項 1 または 2 に記載の哺乳動物を免疫する方法。

【請求項 6】

前記生物学的基材が、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンおよびポリリジンからなる群より選択される、請求項5に記載の哺乳動物を免疫する方法。

【請求項7】

前記非生物学的基材が、ニトロセルロース、ナイロンおよびポリテトラフルオロエチレンメンブレンからなる群より選択される、請求項5に記載の哺乳動物を免疫する方法。

【請求項8】

前記細胞が、胚または成体起源の細胞である、請求項1～7のいずれか1項に記載の哺乳動物を免疫する方法。

【請求項9】

前記細胞が、外胚葉、内胚葉、または中胚葉起源の細胞である、請求項1～8のいずれか1項に記載の哺乳動物を免疫する方法。

10

【請求項10】

前記細胞が、ASC細胞、ESC細胞、ROG細胞、BUD細胞、RED細胞、NODD細胞、BR516細胞、RL-65細胞、およびNEP細胞からなる群より選択される、請求項1に記載の哺乳動物を免疫する方法。

【請求項11】

特定の細胞型の表面抗原に結合するモノクローナル抗体を産生する方法であり、以下の工程：

(a) リンパ細胞と不死化細胞株とを融合させて、モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを形成する工程、ここで、当該リンパ細胞は、ヒト以外の哺乳動物に対して異種である特定の細胞型の複数の生存可能でかつインタクトな細胞を用いて免疫した、当該ヒト以外の哺乳動物から採取されたものであり、ここで該細胞の表面は血清を含まず、そして該細胞は、アジュバントを用いないでまたはRibiアジュバントを用いて前記ヒト以外の哺乳動物に導入されたものである；

20

(b) モノクローナル抗体の分泌のために好ましい条件下で前記ハイブリドーマを培養する工程；および

(c) 工程(a)の生存可能で、かつインタクトな細胞上に存在する表面抗原に結合するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを選択する工程、

を包含する、方法。

【請求項12】

30

前記選択が、イムノアッセイによってもたらされる、請求項11に記載のモノクローナル抗体を産生する方法。

【請求項13】

前記イムノアッセイが、ELISAおよびイムノプロットからなる群より選択される、請求項12に記載のモノクローナル抗体を産生する方法。

【請求項14】

前記分泌が細胞選別プロセスによってもたらされる、請求項11に記載のモノクローナル抗体を産生する方法。

【請求項15】

前記細胞を選別プロセスが、FACSである、請求項14に記載のモノクローナル抗体を産生する方法。

40

【請求項16】

前記モノクローナル抗体が、前記表面抗原の細胞外ドメインに結合する、請求項11～15のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を産生する方法。

【請求項17】

前記細胞が無血清培地中で培養されたものである、請求項11～16のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を産生する方法。

【請求項18】

前記細胞が単層の形態で増殖されたものである、請求項11～17のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を産生する方法。

50

【請求項 19】

前記細胞が凝集体の形態で増殖されたものである、請求項11～17のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を産生する方法。

【請求項 20】

前記細胞が生物学的基材または非生物学的基材^上で増殖されたものである、請求項11～17のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を産生する方法。

【請求項 21】

前記生物学的基材が、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンおよびポリリジンからなる群より選択される、請求項20に記載のモノクローナル抗体を産生する方法。

【請求項 22】

前記非生物学的基材が、ニトロセルロース、ナイロン、およびポリテトラフルオロエチレンメンブレンからなる群より選択される、請求項20に記載のモノクローナル抗体を産生する方法。

【請求項 23】

前記細胞が胚または成体起源の細胞である、請求項11に記載のモノクローナル抗体を産生する方法。

【請求項 24】

特定の細胞型に存在する細胞表面抗原の組み合わせを決定する方法であって、以下の工程：

(a) リンパ細胞と不死化細胞株とを融合させて、モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを形成する工程、ここで、当該リンパ細胞は、ヒト以外の哺乳動物に対して異種である特定の細胞型の複数の生存可能でかつインタクトな細胞を用いて免疫した、当該ヒト以外の哺乳動物から採取されたものであり、ここで該細胞の表面は血清を含まず、そして該細胞は、アジュバントを用いないでまたはRibiアジュバントを用いて前記ヒト以外の哺乳動物に導入されたものである；

(b) モノクローナル抗体の分泌のために好ましい条件下で前記ハイブリドーマを培養する工程；

(c) 工程(a)の生存可能で、かつインタクトな細胞に存在する該細胞表面抗原に結合するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを選択する工程；および

(d) 該モノクローナル抗体が結合する該抗原を同定する工程であって、それによって該特定の細胞型上に存在する細胞表面抗原の組み合わせを決定する、工程、を包含する、方法。

【請求項 25】

請求項24に記載の方法であって、ここで工程(e)の前記抗原を同定する工程が、特定の細胞型のcDNAを得る工程、存在する場合に対応する前記内在性抗原のレベルよりも少なくとも5倍高いレベルで第2の細胞型においてcDNAを発現する工程、および(c)において同定された前記ハイブリドーマによって分泌される前記モノクローナル抗体に特異的に結合するための該第2の細胞型の細胞をスクリーニングする工程を、さらに包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫学の分野にある。詳細には、本発明は、特定の細胞型の代表である、抗原(特に、細胞表面抗原)に結合可能なモノクローナル抗体の集団の産生に関連する。本発明に具現化される組成物および方法は、組織選択的、部分組織選択的、または細胞型特異的である、モノクローナル抗体を単離するために特に有用である。

【背景技術】

【0002】

細胞表面抗原(CSA)は、細胞形質膜上に固定された分子である。CSAは、形質膜の構成成分としてのみならず、さらに重要なことには、種々の生物学的機能を支配する制御エ

10

20

30

40

50

メントとして働く、タンパク質、糖タンパク質、ポリサッカリドおよび脂質の大きなファミリーを構成する。多数のCSAが、同定され、クローン化され、そして広範囲の細胞応答において最高に達する成長因子およびホルモンのような外部刺激によって引き起こされる、シグナルの伝達において中心的な役割を果たすことが見出されている。それらは、細胞分裂、細胞分化、細胞アポトーシスおよび細胞運動性である。特にレセプターおよび接着タンパク質のような細胞表面抗原における欠損は、今や、膨大な疾患（多数の癌の形態、血管疾患および神経疾患を含む）を説明することが、知られている。

【0003】

特定の細胞型の細胞表面抗原の同定は、しばしば、対応するモノクローナル抗体を使用する表面抗原のイムノアフィニティー精製の後に、細胞のその型に存在する抗原と反応性のモノクローナル抗体の産生を実行する。モノクローナル抗体のプールを生成するために使用された伝統的な免疫原は、膜抽出物、または血清を補充した培地中で増殖された特定の細胞型のインタクトな細胞から構成される。免疫原の型は、必然的に、特定の細胞型の代表的な抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体の集団を産生も、それらのネイティブな全体配置における抗原に結合するモノクローナル抗体を産生するために至適化もされない。表面抗原の抽出は、界面活性剤、または形質膜二重層をばらばらにすることが知られている他の有機溶媒を含み、従って、そのネイティブな環境から表面抗原を分離する。免疫原として使用される培養細胞中の血清の補充はまた、不利益を述べられている。

10

【0004】

血清は、未決定の活性を有する多くの生体低分子および生体高分子の非常に複雑な混合物である。ほとんどの細胞にとって血清は、細胞が由来する本来の組織において、細胞が接触する生理的液体ではない。インビボでは、細胞は、組織損傷および血液凝固を含む特殊な環境下でのみ、対応する血清に曝露され得る。インビトロでは、血清中に存在する種々のホルモンおよび成長因子は、細胞表面抗原タンパク質、分泌タンパク質、サイトゾルタンパク質および核タンパク質の改変された発現によって付随される過剰な成長および/または最終分化を刺激し得る。

20

【0005】

血清因子の複雑な混合物はまた、特定の細胞型の増殖および/または分化を阻害し得、細胞形態および生存度における変化を生じる。さらに、多数の種類の実体分子は、細胞表面に接着することが知られている。これらの生体分子は、伝達タンパク質（例えば、アルブミン）、付着因子および伝播因子（例えば、コラーゲンおよびフィブロネクチン）および種々の種類の血清脂質を含むが、これらに限定されない。これらの外因性分子の細胞表面への吸着は、特定の細胞型の代表的ではない分子と交差反応する抗体の産生を生じるのみならず、またネイティブな抗原の提示をマスクし得、従ってさらに、生じるモノクローナル抗体プールの「代表物」を損なう。

30

【0006】

従って、特定の細胞型の代表的な抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体の集団を生成するために適用可能な、組成物および方法のかなりの必要性が依然として存在する。これらのモノクローナル抗体の生成は、新規の抗原、および特定の細胞型に存在する表面抗原の組み合わせの描写の同定を非常に容易にする。本発明は、これらの必要性を満たし、同様に関連する利点も提供する。

40

【発明の開示】

【0007】

発明の要旨

本発明の主要な局面は、特定の細胞型の代表的な抗原に結合可能なモノクローナル抗体の集団を生成するための技術を設計することである。この抗体生成の技術は、特定の細胞型において存在しないタンパク質と交差反応する非代表的な抗体の産生を最小化する。この技術はまた、特定の細胞型のネイティブな抗体に結合する複数のモノクローナル抗体の生成のためのインタクトな抗原（特に、表面抗原）の保存を最小化する。このような方法は、特定の体組織において選択的（組織選択的）に発現されるか、特定の領域へ選択的（

50

部分組織選択的)に局在化されるか、またはこれらの組織内の特定の細胞層において選択的(細胞型特異的)に発現される抗原を認識する候補抗体の独特なプールを産生する。

【0008】

従って、本発明は、宿主哺乳動物に対して異種である特定の細胞型の代表的な抗原に結合するモノクローナル抗体の集団を生成するために、宿主哺乳動物を免疫化するための方法を提供する。この方法は、上記の細胞型の複数の生存可能な、かつインタクトな細胞を哺乳動物に導入することを含み、ここでこの細胞の表面は血清を含まない。

【0009】

1つの局面において、宿主哺乳動物を免疫化するために使用される細胞を、無血清培地中で培養した。別の局面において、免疫に使用される細胞を、単層または凝集体の形態で増殖した。なお別の局面において、その細胞を、生物学的基材または非生物学的基材で増殖した(ここで、この生物学的基材は、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンおよびポリリジンからなる群より選択され;そして、ここで非生物学的基材は、ニトロセルロース、ナイロンおよびポリテトラフルオロエチレンメンブレンからなる群より選択される)。

10

【0010】

さらに別の局面において、免疫化に使用される細胞は、胎児性細胞または成人細胞である。さらに別の局面において、この細胞は、外胚葉細胞であるか、または外胚葉由来または中胚葉由来である。好ましい実施形態において、細胞は、ASC細胞、ESC細胞、ROG細胞、BUD細胞、RED細胞、NODD細胞、BR516細胞、RL-65細胞、およびNEP細胞からなる群より選択される。

20

【0011】

本発明はまた、特定の細胞型の表面抗原に結合するモノクローナル抗体を生成する方法を提供する。この方法は、以下の工程を包含する:(a)宿主哺乳動物に対して異種である特定の細胞型の複数の生存可能な、かつインタクトな細胞を用いて宿主哺乳動物を免疫する工程であって、ここで細胞の表面は血清を含まない、工程;(b)モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを産生するための不死化細胞株と免疫された哺乳動物由来のリンパ球とを融合する工程;(c)モノクローナル抗体の分泌のために好ましい条件下でハイブリドーマを培養する工程;および(d)免疫に使用された生存可能な、およびインタクトな細胞に存在する表面抗原に結合するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを選択する工程。1つの局面において、ハイブリドーマの選択は、ELISAまたはイムノプロット法のような免疫学的検定法によって影響される。1つの局面において、ハイブリドーマの選択は、細胞を仕分けするプロセス(例えば、FACS)によって影響される。

30

【0012】

本発明は、上述の方法によって産生されたハイブリドーマの集団およびモノクローナル抗体の集団を含む。1つの局面において、このように産生されたモノクローナル抗体は、細胞表面抗原の細胞外ドメインに特異的に結合する。

【0013】

本発明はまた、血清生体分子との実質的な免疫学的反応性を欠き、そして組織選択的、部分組織選択的、または細胞型特異的である抗原と反応する少なくとも1つの抗体を含むモノクローナル抗体の集団を提供する。

40

【0014】

本発明はさらに、以下の工程を包含する、特定の細胞型に存在する細胞表面抗原の組み合わせを決定する方法を提供する:(a)宿主哺乳動物に対して異種である特定の細胞型の複数の生存可能な、およびインタクトな細胞を用いて哺乳動物を免疫する工程であり、ここで細胞の表面は血清を含まない;(b)モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを産生するための不死化細胞と免疫された哺乳動物由来のリンパ球とを融合する工程;(c)モノクローナル抗体の分泌のために好ましい条件下でハイブリドーマを培養する工程;(d)生存可能な、かつインタクトな(a)の細胞に存在する細胞表面抗原に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択する工程;および(e)モノク

50

ーナル抗体が結合する抗原を同定し、それによって上記の特定の細胞型に存在する細胞表面抗原の組み合わせを決定する工程。

【0015】

1つの局面において、対応する抗原の同定は、さらに特定の細胞型のcDNAを得ること、存在する場合には対応する内在性の抗原のレベルよりも、少なくとも5倍高いレベルでcDNAを第2の細胞において発現させること、および上記(d)において選択されたハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体に対する特異的な結合について第2の細胞型の細胞をスクリーニングすることを包含する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本開示、種々の刊行物、特許および公開された特許明細書の全体は、同一に扱う引用によって参考にされる。これらの刊行物、特許、および公開された特許明細書は、本明細書中で本発明に関係がある当該技術常識をより十分に記載するために本開示中に参考として援用される。

【0017】

定義

本発明の実施は、他に示さない限り、当該分野の技術内の免疫学、分子生物学、微生物学、細胞生物学および組換えDNAの従来技術を使用する。例えば、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第2編(1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F.M.Ausubelら、編、(1987)); 一連のMETHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press、Inc.) : PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M.J.MacPherson、B.D.HamesおよびG.R.Taylor編(1995))、HarlowおよびLane編(1988) ANTIBODIES、A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (R.I.Freshney編(1987))を参照のこと。

【0018】

本明細書および特許請求の範囲で使用される場合、文脈において他に明瞭に示されない限り、別々の形態「a」、「an」および「the」とは、複数の言及を含む。例えば、用語「細胞」は、その混合物を含む、複数の細胞を含む。

【0019】

本明細書中で使用される場合、用語「抗体」とは、ポリペプチド、または少なくとも1つの抗体結合部位から構成されるポリペプチドの群をいう。「抗原結合部位」または「結合ドメイン」は、内部表面形状および抗原との免疫学的反応を可能にする抗原のエピトープの特徴に相補的な電荷分布との3次元の結合スペースを形成するための抗体分子の可変ドメインのフォールディングより形成される。抗体結合部位は、抗原結合に寄与する超可変ループを形成する重鎖および/または軽鎖ドメイン(それぞれ、VHおよびVL)より形成され得る。用語「抗体」は、例えば、脊椎動物抗体、ハイブリッド抗体、キメラ抗体、改変された抗体、一価の抗体、Fabタンパク質、および単一のドメイン抗体を含む。

【0020】

用語「モノクローナル抗体」とは、本明細書中に使用される場合、実質的に同種の抗体の集団を有する抗体組成物をいう。抗体の供給源、またはそれが作製される様式に関して限定することを意図しない。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原性部位に対して指向される。典型的に異なる決定基(エピトープ)に対し指向される異なる抗体を含む従来の(ポリクローナル)抗体の調製と対比して、それぞれのモノクローナル抗体は、抗原の単一の決定基に対して指向される。

【0021】

「モノクローナル抗体の集団」とは、複数の異種モノクローナル抗体をいい、すなわち、個々のモノクローナル抗体(集団を含む)は、互いとは別の抗原性決定基を認識し得る。

ポリペプチドまたは他の物質を含む他の参照抗原に結合するよりも、より大きな親和性またはアビディティで結合する場合、抗体は、抗原に「特異的に結合する」。

本明細書中で使用される場合、「抗原」とは、抗体によって特異的に認識され、そして

10

20

30

40

50

結合される物質を意味する。抗原としては、ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、多糖類および脂質；その一部およびその組み合わせが挙げられ得る。

【0022】

用語「免疫原」は、一般に当業者に公知である。それは、適した宿主（通常は哺乳動物）に注入される場合、抗体の産生を刺激可能な抗原である。化合物は、結合価を高めるためにキャリアと架橋するか、または結合すること、免疫応答を高めるためにマイトジェンと混合すること、および提示を増強するためにアジュバントと併用することを含む、当該分野で公知の多くの技術によって免疫原性を与えられ得る。

【0023】

本明細書中で使用される場合、用語「表面抗原」とは、細胞の形質膜成分をいう。それは、形質膜を構成する内在性膜タンパク質および周辺膜タンパク質、糖タンパク質、多糖類ならびに脂質を含む。「内在性膜タンパク質」は、細胞の形質膜の脂質2重層にわたって広がる膜貫通タンパク質である。典型的な内在性膜タンパク質は、一般的に疎水的なアミノ酸残基を含む、少なくとも1つの「膜貫通セグメント」からなる。周辺膜タンパク質は、脂質2重層の疎水的な内部に広がらず、そして他の膜タンパク質との非共有結合性の相互作用によって膜表面に結合される。

10

【0024】

細胞またはポリペプチドに対して適用される場合、「免疫学的反応性」とは、本発明の抗体に特異的に結合する細胞またはポリペプチドの能力をいう。モノクローナル抗体の集団に対して適応される場合、「免疫学的反応性」とは、特定の細胞型の代表的な抗原に特異的に結合する集団の能力をいう。

20

【0025】

免疫化のために使用される細胞に対して適応される場合、用語「異種」とは、細胞がレシピエントとは遺伝子型の異なる実体由来であることを意味する。例えば、異種細胞は、受容者と同じ種とは、異なる種または異なる個体由来であり得る。1つの種の個体由来の胎児性細胞は、同じ種の成体に対して異種である。

【0026】

細胞が、それぞれ胚の3つの胚葉（外胚葉、内胚葉、または中胚葉）の1つ由来である場合、細胞は、「外胚葉」「内胚葉」または「中胚葉」起源である。外胚葉は、表皮の細胞、および神経系を産生する外層である。内胚葉は、膵臓および肝臓を含むが、これらに限定されない消化管およびその関連した器官の裏層を産生する内層である。中層、中胚葉は、いくつかの器官（心臓、腎臓、生殖腺を含むがこれらに限定されない）、結合組織（例えば、骨、筋肉、腱）、および血液細胞を生じる。

30

【0027】

用語「培地」、「細胞培養培地」および「培養培地」は、交換可能に使用される。これらの用語は、培養において脊椎動物細胞が増殖する水性環境をいう。培地は、物理化学的な環境、栄養環境、およびホルモンの環境を含む。細胞培養培地が、本質的にいかなる哺乳動物供給源由来の血清（例えば、ウシ胎児、ウマ、ヒト、ウサギ由来の血清）を含まない場合、この培地は「無血清」である。「本質的に、含まない」によって、細胞培養培地が約0～5%の間の血清、好ましくは約0～1%の間の血清、最も好ましくは約0～0.1%の血清を含むことを意味する。

40

【0028】

「定義された培地」とは、培地の成分が既知であるような培養における細胞の生存および/または増殖に必要な栄養要求およびホルモン要求を含む培地をいう。伝統的に、定義された培地は、増殖および/または生存に必要な栄養因子および成長因子の添加によって処方されている。

【0029】

典型的に、定義された培地は、以下のカテゴリーの1つ以上からの少なくとも1つの成分を提供する：a) 全ての必須アミノ酸、および通常は20のアミノ酸+シスチンの基本セット；b) エネルギー源、通常グルコースのような炭水化物の形態において；c) 低濃

50

度で必要とされるビタミンおよび/または他の有機化合物；d)遊離脂肪酸；ならびにe)微量元素、ここで微量元素は、典型的に非常に低濃度（通常はマイクロモラーの範囲）で必要とされる、無機化合物または天然に生じる元素として定義される。定義された培地はまた必要に応じて、以下の任意のカテゴリから1つ以上の成分が補充され得る：a)1つ以上の分裂促進薬剤；b)例えば、カルシウム、マグネシウムおよびリン酸塩のような塩または緩衝液；c)例えば、アデノシンおよびチミジン、ヒポキサンチンのようなヌクレオシドおよび塩基；ならびにd)タンパク質および組織の加水分解産物。

【0030】

「分裂促進薬剤」または「成長因子」は、哺乳動物細胞の有糸分裂を刺激する分子である。一般的に、分裂促進的薬剤または成長因子は、細胞培養において哺乳動物細胞の生存および分裂を増強し、そしてポリペプチドである。分裂促進ポリペプチドは、産生される方法（例えば、分子の内在性供給源から単離され得るか、または組換え技術を含む合成技術によって産生され得る）に関係なく、「ネイティブ」または「ネイティブな配列」ポリペプチド（すなわち、天然に生じる成長因子のアミノ酸配列を有する）、あるいはまたはその改変体変異体（以下の定義参照のこと）であり得る。

10

【0031】

好ましくは、分裂促進ポリペプチドはヒト由来の成長因子と同じアミノ酸配列、またはそのフラグメントを有する。非限定的な例としては、以下が挙げられる：erbB レセプターファミリーの1以上のメンバーの活性化因子；培養培地におけるcAMPのレベルを上昇させる薬剤（例えば、フォルスコリン、コレラ毒素、cAMPまたはそれらのアナログ）；神経細胞接着分子（N-CAM）のような接着分子、ラミニンまたはフィブロネクチン；プロゲステロン；骨由来神経栄養因子（BDNF）および線毛神経栄養因子（CNTF）のような神経栄養因子；ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン-4、ニューロトロフィン-5またはニューロトロフィン-6（NT-3、NT-4、NT-5またはNT-6）；またはNGF- のような神経成長因子；血小板由来成長因子（PDGF）；酸性FGF（aFGF）および塩基性FGF（bFGF）のような線維芽細胞成長因子；血管内皮成長因子（VEGF）；TGF- 、およびTGF- 1、TGF- 2、TGF- 3、TGF- 4またはTGF- 5を含むTGF- のようなトランスホルモン成長因子（TGF）；IGF-I、IGF-IIおよびデス（1-3）-IGF-I（脳IGF-I）を含む、シンスリン様成長因子；インスリン様成長因子結合タンパク質；ならびにエストロゲン、テストステロン、甲状腺ホルモン、インスリンおよびMather, J.P.およびRoberts, P.E. (1998) 「Introduction to Cell and Tissue Culture」、Plenum Press、New Yorkの138～139頁の表8.2に列挙された、任意のこれらのマイトジェンのようなホルモン。

20

30

【0032】

本明細書中において「被験体」または「個体」は交換可能に使用され、これらは、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトをいう。哺乳動物は、ウサギ、マウス、サル、ヒト、家畜、競技用動物（sport animal）、およびペットを含むが、これらに限定されない。

【0033】

免疫原の調製

無血清細胞培養の確立

本発明の免疫原は、細胞表面が血清を含まない、生存可能な、およびインタクトな哺乳動物細胞の実質的に同種の集団を含む。培養において、増殖可能な任意の哺乳動物細胞が、候補免疫原である。インビトロ培養に適切な細胞は、胚組織または成体組織、正常組織または腫瘍性組織、外胚葉由来の発生起点を有する組織、内胚葉由来の発生起点を有する組織、または中胚葉由来の発生起点を有する組織由来であり得る。

40

【0034】

現在、培養において増殖し得る特定の細胞型の非限定的な例としては、以下が挙げられる：線維芽細胞のような結合組織エレメント、骨格組織（骨および軟骨）、骨格筋、心筋および平滑筋、上皮組織（例えば、肝臓、肺、乳房、皮膚、膀胱および腎臓）、神経細胞（グリアおよびニューロン）、内分泌細胞（副腎細胞、下垂体細胞、膵臓細胞、島細胞）

50

、メラニン形成細胞、および多数の異なる型の造血細胞。培養における細胞は、体組織から新しく単離され得るか（初代培養として既知）、または初代培養に存在する細胞の拡大および/またはクローニングによりサブクローン化される（細胞株として既知）。

【0035】

細胞表面が、血清を含まないことを確認するために、典型的に細胞を、血清を欠くが、特定の細胞型の生存および/または増殖に必要なホルモン、成長因子または任意の他の因子を補充した定義された培地において増殖させる。細胞の生存を支持する定義された培地は、生存、形態、代謝の能力、および潜在的に細胞が分化する能力を維持するが、細胞増殖を促進する定義された培地は、細胞増殖（proliferation）または増殖（multiplication）に必要な全ての化学物質を提供する。インビトロでの哺乳動物細胞の生存および増殖を支配する一般的なパラメーターは、当該分野において十分確立されている。

10

【0036】

異なる細胞培養系において制御され得る物理化学的なパラメーターは、例えば、pH、 pO_2 、温度および浸透圧である。細胞の栄養要求は、通常、最適な環境を提供するために開発された標準培地処方提供される。栄養分は、いくつかのカテゴリーに分けられ得る：アミノ酸およびその誘導体、炭水化物、糖、脂肪酸、複合脂質、核酸誘導体およびビタミン。細胞の代謝を維持するための栄養分以外に、ほとんどの細胞はまた、無血清培地において増殖するための少なくとも1つの以下の群からの1つ以上のホルモンを必要とする：ステロイド、プロスタグランジン、成長因子、下垂体ホルモン、およびペプチドホルモン（Sato, G.H.ら、「Growth of Cells in Hormonally Defined Media」、Cold Spring Harbor Press, N.Y., 1982）。

20

【0037】

ホルモンに加えて、細胞は、インビトロでの生存および増殖のために、トランスフェリン（血漿鉄輸送タンパク質）、セルロプラズミン（銅輸送タンパク質）および高密度リボタンパク質（脂質キャリア）のような、輸送タンパク質を必要とし得る。ホルモンまたは輸送タンパク質のセットは、各々の細胞型によって変化する。これらのホルモンまたは輸送タンパク質のほとんどは、外因的添加されているか、またはまれな場合には、変異体細胞株は、特定の因子を必要としないことが見い出されている。

【0038】

特定の細胞型に対する定義された培地の処方は、一般的に、当該分野で広く知られた3つのアプローチによって進められる。第1は、血清機能を果たす種々の組み合わせの生体分子（マイトジェンのような細胞特異的ホルモンおよび非特異的ホルモン、輸送タンパク質、付着因子および伝播因子）を添加することによって既存の基本栄養培地の補充を含む（Barnes, D.およびSato, G. (1980) Anal. Biochem., 102:255）。

30

【0039】

それぞれの基本栄養培地は、市販されている。これらの最小培養培地の非限定的な例として、F12/DME、Ham's F10 (Sigma)、Minimal Essential Medium (MEM, Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma) および Iscove's Modified Eagle's Medium (IMDM) が挙げられる。さらに、HamおよびWallace (1979) Meth. Enz., 58:44、BarnesおよびSato (1980) Anal. Biochem., 102:255またはMather, J. P. および Roberts, P. E. (1998) 「Introduction to Cell and Tissue Culture」、Plenum Press, New Yorkに記載される基本栄養培地のいずれかが使用され得る。

40

【0040】

特にポリペプチド因子のような、生体分子を補充することの試験は、増殖刺激性であると発見されたポリペプチドの存在下で新しいポリペプチド因子を段階的に試験する方法で最もよくなされる。ポリペプチド因子の効果が、めったに単純付加的でないので、いくつかの場合において、これは基礎的である。あるいは、いくつかのポリペプチド因子は、細胞の生存を維持するか、または単独で増殖を刺激し得るが、共に添加される場合、効果がなくなるか、または阻害性である。一般的に、細胞は、最適な増殖のために無血清培地においてインスリンおよびトランスフェリンを必要とする。

50

【 0 0 4 1 】

これら2つの因子は、始めに試験されるべきである。ほとんどの細胞株はまた、1つ以上の成長因子を必要とする。これらには、上皮成長因子(EGF)、線維芽細胞成長因子(FGFs)、インスリン様成長因子IおよびII(IGF1、IGFII)、神経成長因子(NGF)、ヘレグリン(heregulin)、ニューレグリン(neuregulin)、トランスフォーミング成長因子(TGFs)、血小板由来成長因子(PDGFs)、インターロイキン(ILs)および他の造血細胞成長因子が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 4 2 】

特定の細胞型を培養するために適した定義された培地を確立するための第2のアプローチは、細胞増殖が制限されるまで、血清濃度を下げることにより、既存の栄養培地の新しい処方を進め、次いで、増殖が再開するまで、栄養培地の各々の成分の濃度を調節することである(Ham,R.G.およびMcKeehan,W.L.(1979) Academic Press、53:44;Ham,R.G.(1981) Handbook of Experimental Pharmacology、57:13)。

10

【 0 0 4 3 】

これら2つの技術、胚器官または成体器官、正常組織または腫瘍組織、外胚葉由来の細胞、中胚葉由来の細胞または内胚葉由来の細胞由来の多くの哺乳動物細胞株を使用することが、無血清培地において確立されている。Freshney,R.I.(1986)「Animal Cell Culture, A Practical Approach」、IRL pressは、線維芽細胞、上皮細胞、神経細胞、造血細胞、リンパ細胞を含む非形質転換細胞、ならびに多様な癌、腺癌および神経芽細胞腫由来の形質転換された細胞の44の無血清培養のための培地条件を要約する。Sato,G.H.ら(1982)「Growth of Cells in Hormonally Defined Media」は、無血清培地において内分泌、外分泌、乳房、神経または生殖路起源の細胞を培養するための手順を詳述する。

20

【 0 0 4 4 】

1つの細胞型に対して処方された培地は、同じ細胞型である場合には、一般に、他の株および独立した起源の初代培養の増殖を支持するので(Li,R.H.ら、(1996) J. Neurosci. Methods、67:57-69;Li,R.H.ら、(1996) J. Neuroscience 16(6):2012-2019;Levi, A.D.O.ら(1997) Experimental Neurology 143:25-36)、別のよく確立されたアプローチは、同様の型の細胞の生存および/または増殖を支持することがすでに見い出されたものと最も密接に関連した定義された培地を試験することを含む。細胞型の多様性に対する栄養要求およびホルモン要求についての情報の膨大な財産は、当業者が、任意の所定の細胞型の増殖または生存のために必要な培地条件のセットについて慣用的に探索することを非常に容易にしている。無血清細胞培養を確立するために、上記アプローチのいずれか1つ、またはその改変された手順が、単独でか、または任意の組み合わせのいずれかで使用され得る。

30

【 0 0 4 5 】

従って、本発明は、無血清培地において確立された種々の細胞株を提供し、それらの細胞株は引き続いて、これらの細胞株の代表的な抗原を認識するモノクローナル抗体の集団を産生するために免疫原として使用される。1つの実施形態において、本発明は、ラット脊髄神経節由来の胚Schwann細胞(ESC)および成体Schwann細胞(ASC)を提供する(米国特許第5,721,139号;米国特許第5,714,385号;Li,R.(1997) Endocrinology、138:2648-2657)。別の実施形態において、本発明は、解剖されたラットe12胚膵臓芽(BUD)およびラットe17管上皮(RED)の初代培養より確立された2つの膵臓上皮細胞株を含む。

40

【 0 0 4 6 】

さらに別の実施形態において、本発明は、RL-65細胞株のようなラット肺の細気管支上皮細胞を提供する。さらに別の実施形態において、本発明は、ラット卵巣卵胞(ROG)由来の未分化な顆粒層細胞株を提供する。さらに別の実施形態において、本発明は、新生児肺上皮細胞株BR516、ラット初期胚(9日)神経上皮細胞株NEP、および非肥満糖尿病マウス膵臓管上皮細胞由来の上皮細胞株NODDを提供する。RL-65、ROG、BR516、NEP細胞を産生する方法は、米国特許第5,364,785号;Li,R.ら(1997) Endocrinology、138(7):2648-2657;Roberts,P.E.(1992) Animal Cell Technology:Basic and Applied Aspects、335-341;

50

Roberts, P.E. (1990) Am. J. Physiol., 3:L415-L425); および Li, R.H. ら、(1996) Endocrine 5:205-217 に記載され、これらは本明細書中に参考として援用される。無血清培地中で NODD 細胞を確立するための手順は、本質的に本明細書中に記載された RED 細胞への適応と同じ手順である (実施例 1 参照のこと)。

【0047】

細胞生存度の維持

本発明の免疫原は、生存可能で、かつインタクトな細胞を含む。生存可能な細胞は、固相基材に固定された単層としてか、また懸濁培養において凝集体として増殖され得る。基材の選択は、細胞の型によって大部分決定される。ほとんどの細胞は、例えば、ガラス、プラスチックまたはセラミック物質でできた基材において増殖され得る。ニューロン、上皮細胞および筋細胞のような特定の細胞型について、細胞の付着および伝播を増強する荷電した物質を用いてプレコーティングされた基材が好ましい。一般的に使用されるコーティング物質としては、正味の正の電荷を保有する生物学的基材が挙げられる。生物学的基材の非限定的な例としては、ラミニン、フィブロネクチン、コラーゲンのような細胞外マトリックス/付着タンパク質、またはポリリジンのような合成ポリペプチドが挙げられる。ニトロセルロース、ナイロン、ポリテトラフルオロエチレンからできたメンブレン、または任意の他の移植物質のような種々の非生物学的基材もまた、無血清培地における細胞の増殖を支持するために使用され得る。

【0048】

異なる基材において培養された細胞を収集する場合、膜完全性を維持するために、および細胞膜成分を保存するために、注意されたし。セリンプロテイナーゼ、トリプシンのような強力なタンパク質分解酵素の作用によって固定された細胞または細胞層を分離する伝統的な方法とは異なり、本発明の細胞免疫原は、典型的に、細胞表面抗原に対する損傷を最小化する薬剤によって培養基材から除去される。これらの試薬としては、細胞基材付着に必要であることが既知の 2 価金属イオン (例えば、カルシウムおよびマグネシウム) に結合する、EDTA および EGTA のようなキレート剤が挙げられる。

【0049】

他の適した細胞分離薬剤は、セリンプロテイナーゼインヒビター (例えば、ダイズトリプシンインヒビター) と共に使用される場合、コラゲナーゼ、ディスパーゼ (dispases) および中性プロテイナーゼを含む。これらの試薬を用いる細胞の処理は、たいていは、細胞表面タンパク質を保存する一方で、細胞外基質成分の破損を生じる。固体基材に固定された細胞を引き離すために必要とされる時間は、選択されたプロテアーゼ酵素に依存して変化し得るが、通常約 3 分 ~ 30 分、好ましくは約 5 分 ~ 15 分の間である。酵素学的処理は、室温または約 37 °C で行われ得る。過剰な酵素は、当業者によって慣用的に調製される、生理学的な範囲内の pH および塩濃度を有する緩衝液を用いて、穏やかに洗浄することによって除去され得る。

【0050】

免疫化の前に、細胞生存度は、膜完全性の測定によって確認され得る。膜完全性を評価するための方法は、当該分野において公知である。最も共通のアッセイは、生細胞または死んだ細胞のいずれかと反応する色素を用いて細胞を染色する工程を含む。当業者に明らかのように、例示的な色素としては、トリパンブルー、エオシン Y、ナフトレンブラック、ニグロシン、エリトリシン B、およびファストグリーンが挙げられる。

【0051】

所望の場合、細胞免疫原は、宿主免疫応答を増強するためにアジュバントと混合され得る。適したアジュバントとしては、水酸化アルミニウム、ミョウバン、QS-21 (米国特許第 5,057,540 号)、前駆型形態および修飾された形態を含む DHEA (例えば、DHEA-S、DHEA のスルホン化された形態) (米国特許第 5,407,684 号、同第 5,077,284 号)、 α -2 ミクログロブリン (WO 91/16924)、ムラミルジペプチド、ムラミルトリペプチド (米国特許第 5,171,568 号) およびモノホスホリル脂質 A (米国特許第 4,436,728 号; WO 92/16231) およびその誘導体 (例えば、Detox™)、ならびに BCG (米国特許第 4,726,947 号) が挙げられ

10

20

30

40

50

る。

【 0 0 5 2 】

他の適したアジュバントとしては、例えばTakahashiら (1990) Nature 344:873-875によって記載されるアジュバントのような、Freund'sアジュバント、アルミニウム塩、スクアレン混合物 (SAF-1)、ムラミルペプチド (MDP)、サポニン誘導体、ミコバクテリウム壁調製物、ミコール酸誘導体、非イオン性ブロックコポリマー界面活性剤、Quil A、コレラ毒素Bサブユニット、ポリホスファゼン (polyphosphazene) および誘導体、ならびに免疫刺激複合体 (ISCOMs) が挙げられるが、これらに限定されない。好ましいアジュバントは、Ribi Immunochem Research, Inc.によって製造されるRibi Adjuvant Systemである。

10

【 0 0 5 3 】

免疫化およびハイブリドーマの産生

宿主動物の免疫化の経路およびスキームは、一般に、抗体の刺激および産生のための確立された技術および従来技術と調和されている。

【 0 0 5 4 】

マウスが試験形態として使用されたが、ヒトまたはその抗体産生細胞を含む、任意の哺乳動物被験体が、ヒトを含む、哺乳動物のハイブリドーマ細胞株のための基礎として役立つために本発明のプロセスに従って、操作され得ることが意図される。典型的に、宿主動物を、免疫原性量の細胞を用いて腹腔内で播種し、次いで同様の量の免疫原でブーストする。代わりとして、非生物学的膜マトリックス上で増殖した細胞を、宿主動物の腹腔内に外科的に移植した。リンパ球、好ましくは宿主由来の脾臓リンパ球を、最後のブーストの2~3日後に収集し、そして細胞懸濁液を、融合において使用するために、そこから調製する。

20

【 0 0 5 5 】

ハイブリドーマを、Buck,D.W.,ら (1982) In Vitro, 18:377-381によって改変されたKohler,B.およびMilstein,C. (1975) Nature 256:495-497の一般的な体細胞ハイブリダイゼーション技術を使用してリンパ球および不死化ミエローマ細胞から調製する。利用可能なミエローマ株としては、X63-Ag8.653が挙げられるが、これらに限定されず、そしてSalk Institute、Cell Distribution Center、San Diego、Calif., USAからのそれらをハイブリダイゼーションに使用し得る。基礎的に、この技術は、当業者に周知のポリエチレングリコールのようなフューゾゲン (fusogen) を使用してか、または電気的手段によって、ミエローマ細胞とリンパ球を融合することを含む。

30

【 0 0 5 6 】

融合後、細胞を融合培地より分離し、そして選択的な増殖培地 (例えば、HAT培地) で増殖させ、ハイブリダイズしない親細胞を排除する。血清を補充されるか、または補充されない本明細書中で記載される培地のいずれもが、モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを培養するために使用され得る。細胞融合技術の別の代替として、EBV不死化B細胞が、本発明のモノクローナル抗体を産生するために使用され得る。ハイブリドーマは、所望の場合、拡大し、そしてサブクローン化され、そして上清は、従来のイムノアッセイ手順 (例えば、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ、または蛍光イムノアッセイ) によって、抗免疫原活性についてアッセイされる。

40

【 0 0 5 7 】

本発明のハイブリドーマは、免疫化に使用される細胞の型の代表的な抗原について特異的なモノクローナル抗体を産生する親ハイブリドーマの全ての誘導体、子孫細胞を含む。

このような抗体を産生するハイブリドーマは、公知の手順を使用してインビトロまたはインビボで増殖され得る。所望の場合、モノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム沈澱、ゲル電気泳動、透析、クロマトグラフィー、および限外濾過のような従来免疫グロブリン精製手順によって、培養培地または体液から単離され得る。望まれない活性が存在する場合、例えば、調製物を固相に付着した免疫原からできた吸着剤 (adsorbant) を通して流し、そして免疫原から離れた所望の抗体を溶出するか、または放出することに

50

よって除去され得る。

【0058】

モノクローナル抗体の特徴づけおよび選択

宿主動物を、血清を含まない複数のインタクトで、かつ生存可能な細胞で免疫化することは、以下の特徴を示すモノクローナル抗体の集団を産生する：(a)血清生体分子との実質的な免疫学的反応性を欠く特徴；(b)免疫化に使用される型の細胞の代表的な表面抗原に結合する特徴；(c)抗原と反応性の少なくとも1つのモノクローナル抗体を含む特徴であって、ここでこれらの抗体は、特定の体組織において(組織選択的)、特定の領域に局在化して(部分組織選択的)、またはこれらの組織内の特定の細胞層において(細胞型特異的)選択的に発現される。

10

【0059】

実質的な免疫学的反応性の不足は、全血清生体分子に対するモノクローナル抗体の集団を試験することにより決定される。モノクローナル抗体の集団は、約1:10,000の希釈、好ましくは約1:1000の希釈、より好ましくは約1:500の希釈で使用された場合に、それが全血清生体分子に対する検出可能な結合を生じない場合、実質的な免疫学的反応性が不足しているとみなされる。全血清は、約0.001%(v/v)の濃度、好ましくは約0.01%の濃度、より好ましくは0.1%の濃度、さらにより好ましくは1%の濃度で試験され得る。抗原結合は、例えば、ELISAおよび免疫プロットアッセイを含むイムノアッセイにより検出され得る。好ましくは、この検出は、還元ポリアクリルアミドゲル上の電気泳動により分離した全血清生体分子の免疫プロットにより行われる。

20

【0060】

モノクローナル抗体の集団が、特定の細胞型に典型的な表面抗原を認識する能力は、それらのネイティブな配置を示す表面抗原を提示する、その特定の型の生存可能細胞およびインタクトな細胞に対して試験され得る。例えば、表面抗原に結合した抗体は、例えば、標識抗体を、基材に固定した生存可能細胞およびインタクトな細胞と反応させることによるイムノアッセイにより、直接的に検出され得る。代替法では、表面抗原への結合は、細胞を選別することにより評価され得、これは検出可能な薬剤と結合した抗体で標的細胞を標識する工程、次いで細胞選別機において、標識細胞を、標識化されていない細胞から分離する工程を包含する。洗練された細胞分離方法は、蛍光活性化細胞選別(FACS)である。微細な流れの中を一系列で移動する細胞は、レーザービームを通過し、次いで、蛍光標識された抗体が結合した各細胞の蛍光が測定される。

30

【0061】

イムノアッセイおよびFACSのような細胞選別技術はまた、組織選択性、準組織選択性、または細胞型特異的なモノクローナル抗体を単離するために使用され得る。組織選択的なモノクローナル抗体は、被験体由来のすべての体組織において遍在しては発現されない抗原に結合する。体組織の型としては、脾臓、食道、肺、腎臓、結腸、胃、脳、肝臓、心臓、卵巣、皮膚、乳房、筋肉、骨、子宮、膀胱、脊髄、および種々の種類の体液が挙げられるが、これらに限定されない。

【0062】

モノクローナル抗体が、組織内の特定の領域に局在化する標識抗原と結合する場合、そのモノクローナル抗体は準組織選択的である。ほとんどの体組織は、種々の型の細胞の層により構築された複雑な構造である。細胞型特異的なモノクローナル抗体は、単一の組織もしくはその発生的に関連する組織における、特定の細胞層または細胞型において排他的に発現される抗原と反応する。代表的な細胞型特異的なモノクローナル抗体は、以下の細胞型のうちの1つと特異的に結合するモノクローナル抗体である：上皮細胞、内皮細胞、ニューロン、シュワン細胞、筋肉細胞、赤血球、リンパ球、胚細胞、グリア細胞、星状細胞、および間葉細胞。モノクローナル抗体の組織選択性は、一般的に免疫組織化学的分析により試験され、ここで冷凍組織切片もしくは固定組織切片および/または組織ホモジネートは、種々の濃度でこのような抗体で染色される。

40

【0063】

50

モノクロナール抗体の準組織選択性 (selectively) は、試験された組織の種々の切片の染色パターンを比較することにより評価され得る。細胞型特異的なモノクロナール抗体は、異なる型の細胞の粗溶解物を免疫プロットすることにより、または試験されたモノクロナール抗体の、特定の細胞型に固有の表面抗原に対する、特異的な結合に基づいて種々の型の細胞を選別することにより、都合よく同定される。FACSのような細胞選別技術は、表面抗原の細胞外ドメインに結合するモノクロナール抗体を単離するために、特に適用可能である。イムノアッセイおよび細胞選別を行うための手順は、当該分野において十分に確立されており、従って本明細書中ではそれらを詳述しない。

【0064】

本発明のモノクロナール抗体は、多くの異なるキャリアと結合し得る。キャリアは、活性であっても、および/または不活性であってもよい。周知のキャリアの例としては、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、ガラス、天然セルロースおよび改変セルロース、ポリアクリルアミド、アガロースならびに磁鉄鉱が挙げられる。キャリアの性質は、本発明の目的のために可溶性または非可溶性のいずれかであり得る。当業者は、抗体を結合するための他の適切なキャリアについて知っているか、または、例えば慣用的な実験を用いて確認可能である。

10

【0065】

本発明のモノクロナール抗体はまた、検出可能な薬剤またはハプテンに結合体化され得る。この複合体は、HarlowおよびLane(1988) (前出) により記載されるような免疫組織化学のような標準的な免疫化学技術を用いて、サンプルにおいてこの抗体が特異的に結合する抗原を検出するのに有用である。当業者に公知の、多くの異なる標識および標識化方法が存在する。本発明において使用され得る標識の型の例としては、放射性同位体、酵素、コロイド金属、蛍光化合物、生物発光化合物、および化学発光化合物が挙げられる。当業者は、抗体に結合するための他の適切な標識を知っているか、または、例えば慣用的な実験を用いて確認可能である。さらに、これらの標識の本発明の抗体への結合は、当業者によく知られている標準的な技術を用いて行われ得る。

20

【0066】

より高い感度をまた生じ得る別の技術は、低分子量のハプテンへのこの抗体の結合からなる。次いで、これらのハプテンは、第二の反応によって特異的に検出され得る。例えば、ビオチンのようなハプテンは一般的に使用され、これは特異的な抗ハプテン抗体と反応し得る、アビジン、またはジニトロフェリル (dinitrophenyl)、ピリドキサル、およびフルオレセインと反応する。HarlowおよびLane(1988) (前出) を参照のこと。

30

このモノクロナール抗体の集団、および本発明のこのようなモノクロナール抗体を産生するハイブリドーマは、診断的適用および/または治療的適用を有し得る。

【0067】

上記の一般的な技術を適用して、胚性の膀胱細胞に典型的な抗原と反応するモノクロナール抗体の集団が産生された。15の異なるモノクロナール抗体のプールが検査され、そのうち13が、インタクトな透過化処理されていない細胞への結合についての交差競合アッセイにより決定される場合、細胞表面上の異なる抗原を認識する。FACS分析は、この抗体が細胞表面抗原の細胞外ドメインに指向されることを、さらに確認した。2つの代表的なモノクロナール抗体 (Mab2160およびMab2117) を用いて行われた免疫組織化学分析は、特定の体組織、準組織構造物、および組織内の細胞の特定の層を染色するそれらの選択性を明らかにした。

40

【0068】

標的抗原の単離および同定

本発明において具体化されるモノクロナール抗体は、標的抗原を単離およびクローン化するための特異的試薬を提供する。本明細書中で使用される場合、用語「単離された」は、抗原またはそのフラグメントが自然状態で通常に結合している、細胞性およびその他の成分から分離されたことを意味する。

【0069】

50

本発明のモノクローナル抗体により認識される表面抗原は、当業者に周知の多数のプロセスにより単離され得る。代表的な手順は、組織ホモジネートまたは細胞溶解物からの標的抗原の免疫沈降および免疫親和性精製である。両方の方法は、標的抗原を、固相マトリックス（例えば、プロテイン A およびプロテイン G セファロースビーズ）上に固定したモノクローナル抗体へ結合させ、次いで結合した抗原と結合していないタンパク質とを分離し、そして最後に、この抗原を抗体が結合した固相マトリックスから溶出させることにより進行する。

【0070】

溶出した抗原の次の分析は、分子量を決定するための電気泳動、および標的抗原のアミノ酸配列を描写するためのタンパク質配列決定を含む得る。推定アミノ酸配列に基づき、次いで、この抗原をコードするcDNAが、組換えクローン化方法（PCR、ライブラリースクリーニング、既存の核酸データベースにおける相同性検索、またはそれらの任意の組み合わせを含む）により得られ得る。通常使用されるデータベースとしては、GenBank、EMBL、DDBJ、PDB、SWISS-PROT、EST、STS、GSS、およびHTGSが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0071】

好ましい標的表面抗原のクローン化方法は、目的の細胞表面抗原を発現する細胞に対する抗体を「パニング」することによる。この「パニング」手順は、目的の抗原を発現する細胞のcDNAを得、このcDNAを第二の細胞型で過剰発現させ、そして第二の細胞型の細胞を、モノクローナル抗体への特異的結合についてスクリーニングすることにより行われる。

20

【0072】

cDNAは、特定の細胞型由来のmRNAの逆転写により、当該分野において標準的な方法に従って得られ得る。詳細には、mRNAは、種々の溶解酵素または化学溶液を用いて、Sambrookら（「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第2版、1989）に記載される手順に従って単離され得るか、または製造者により提供される添付の指示書に従って、核酸結合樹脂により抽出され得る。次いで、合成cDNAは、第二の型の細胞において抗原を産生するために発現ベクターに導入される。発現ベクターが、エピソームまたは染色体DNAに不可欠な部分のいずれかとして、宿主細胞中で複製可能でなければならないことが意味される。適切な発現ベクターとしては、プラスミド、ウイルスベクター（アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルスを含む）、コスミドなどが挙げられる。

30

【0073】

目的のポリヌクレオチドを含むベクターは、多数の任意の適切な方法により宿主細胞に導入され得、その方法としては、エレクトロポレーション、塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、DEAE-デキストラン、または他の物質を用いるトランスフェクション；微粒子銃（microprojectile bombardment）；リポフェクション；および感染（ここで、クターは、以下で議論されるワクシニアウイルスのような感染性因子である）が挙げられる。導入するベクターまたはポリヌクレオチドの選択は、しばしば宿主細胞の特徴に依存する。

【0074】

異種DNAを過剰発現し得る任意の宿主細胞は、標的表面抗原をコードする遺伝子を単離する目的のために使用され得る。哺乳動物宿主細胞の非限定的な例としては、COS細胞、HeLa細胞およびCHO細胞が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、この宿主細胞は、この宿主細胞における対応する内在性抗原の発現（存在する場合）の、約5倍高いレベル、より好ましくは10倍高いレベル、さらにより好ましくは20倍高いレベルでcDNAを発現する。選択されたモノクローナル抗体への宿主細胞の特異的結合についてのスクリーニングは、イムノアッセイ、または好ましくは、FACSにより行われる。次いで、個々の標的抗原を同定することにより、特定の細胞型において発現される細胞表面抗原の組み合わせが、決定され得る。

40

【実施例】

50

【 0 0 7 5 】

以下の実施例は、本発明の代表的なモノクローナル抗体の調製、特徴付け、および使用の詳細な説明を提供する。これらの実施例は、いかなる様式においても、本発明を限定することを意図されない。

【 0 0 7 6 】

材料および方法実施例 1. 無血清培地における胚性膵管上皮細胞の培養

胚性の管を、以前に記載された手順 (Githens, S.ら (1989) 25:679-688) の改変版を用いて単離した。RED細胞株を生成するために、妊娠 2 日目、3 日目、または 18 日目の Sprague Dawley ラットを、CO₂ 窒息により屠殺した。胚を、20 μg/ml のゲンタマイシンを含む、氷冷 Hank 's Balanced Salt Solution に移した。胚性膵臓 (pancreati) を氷の上で解剖顕微鏡下で取り出し、そして F12/DME 中に置いた。1 ml の F12/DME 中の 12 ~ 15 の膵臓それぞれに、大豆トリプシンインヒビター (1 mg/ml) を含む、25 μl のコラゲナーゼ - ディスペーゼ (dispase) 溶液 (50 mg/ml) を加えた。次いで、組織をより小さいフラグメントに砕くために頻りにピペティングしながら、ディッシュを 37 °C で 30 分間インキュベートした。消化物を、5 % BSA 勾配の上に積み重ねた後に、遠心分離により洗浄した。組織ふるいまたは 200 メッシュの Nitex 布を通す濾過により、さらなる解離を達成した。

【 0 0 7 7 】

組織フラグメント (ほとんどは管) を、F12/DME 中 800 × g で 6 分間遠心分離することにより洗浄し、次いで、以下からなる増殖培地中に再懸濁させた: 14 F を追加した F12/DME: rhu - インスリン (10 μg/ml)、トランスフェリン (10 μg/ml)、EGF (10 ng/ml)、エタノールアミン (1 μM)、アプロチニン (25 μg/ml)、グルコース (5 mg/ml)、ホスホエタノールアミン (1 μM)、トリヨードチロニン (5 pM)、セレン (25 nM)、ヒドロコルチゾン (0.5 μM)、プロゲステロン (10 nM)、フォルスコリン (1 μM)、ヒヘグリン 177-244 (10 nM) およびウシ下垂体抽出物 (BPE) (5 μl/ml、75 μg/ml タンパク質)。

【 0 0 7 8 】

次いで、この細胞懸濁物を、フィブロネクチンでコートした 24 ウェルプレートまたはコラーゲンでコートした 24 ウェルプレートのいずれかに、均等に分配した。培養 48 ~ 72 時間以内で、嚢胞様構造が形成された。これらを、上清を用いて取り出し、洗浄し、14 F 増殖培地中に再懸濁させ、コラーゲンでコートしたプレートまたはフィブロネクチンでコートしたプレートのいずれかに再プレートした。この嚢胞様構造物は、付着し、そして 24 時間以内に広がり始めた。

【 0 0 7 9 】

5 ~ 7 日後、これらの培養物は 75 % コンフルエントであり、このとき、これらをトリプシン - EDTA 中で解離することにより、1:2 の分割比で継代培養し、1 mg/ml の大豆トリプシンインヒビターで中和し、遠心分離により洗浄し、14 F 増殖培地中に再懸濁させ、そしてフィブロネクチンでコートしたプレートにプレートした。その後、この培養物を、3 ~ 4 日ごとに高い分割比 (1:3 ~ 1:5) で分割した。線維芽細胞汚染は最小であり、そして 96 ウェルのマイクロタイタープレートにおける、15 % の自己馴化培地中での連続的なクローン化 (Mather, J.P. および Sato, G.H. (1979) Exp. Cell. Physiol., 124:215-221; Roberts, P.E.ら (1990) Am. J. Physiol., 3: L415-L425) により、一緒に除去した。

【 0 0 8 0 】

BUD 培養物を、妊娠 12 日目の Sprague Dawley ラットから樹立した。胎仔を解剖で取り出した後、背側および腹側の膵臓外反を、外科的に解剖し、そしてこの組織の最初の酵素的な解離なしで、48 ウェルディッシュの別々のウェルで培養した。細胞を上記のように移した。BUD 細胞および RED 細胞の両方は、少なくとも 80 集団倍加にわたって連続培養物中にある。これらを、正常な核型で維持し、ラット起源でありマイコプラズマ (mycoplasma) を含まないことを確認した。

【 0 0 8 1 】

実施例 2. BUD/RED 細胞表面タンパク質に対するモノクローナル抗体の産生

Balb/cマウスを、 5×10^6 のインタクトなBUD細胞またはRED細胞を用いて、アジュバントなしで、毎週10～15週間にわたって免疫した。あるいは、ニトロセルロースディスク上で増殖させた細胞を、2週間毎に6週間、腹腔内に外科的に移植した。免疫したマウス由来の血清を、以下に記載されるような結合のFACS分析により、BUD細胞およびRED細胞に対する抗体について試験した。最も高い力価を有するマウスに、 5×10^6 細胞のさらなる追加免疫を与えた。3日後、このマウスの脾臓由来のリンパ球を、50%ポリエチレングリコール4000を用いて、他書(Oi, V. および Herzenberg, L. (1980) 「Immunoglobulin-Producing Hybrid Cell Lines」)に記載された手順に従って、マウス骨髄腫株X63-Ag8.653と融合させた。

【0082】

融合細胞を、1ウェルあたり200,000細胞の密度で96ウェル組織培養プレートにプレートし、そしてハイブリドーマを、HAT培地補充物(Sigma, St. Louis, MO)を用いて選択した。融合後10日目に、ハイブリドーマ上清を、BUD/RED特異的Mabの存在についてFACSによりスクリーニングした。次いで、BUD細胞株およびRED細胞株に結合するMabを産生するハイブリッドを、TR-1ラット内皮細胞株に対してスクリーニングした。選択したハイブリドーマを、限界希釈によりクローン化して、安定なハイブリドーマを産生した。Mabを腹水中で産生させ、そして抗体をプロテイン質A-セファロースカラム(Fermentech, Inc., Edinburgh, Scotland)で精製し、そしてPBS中4で無菌状態で貯蔵した。

【0083】

実施例3. FACS分析

細胞を、0.5mM EDTAの存在下で15分間かけて組織培養フレイクから剥離し、コラゲナーゼ/ディスペーゼ(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)を用いて10分間処理し、1400rpmで5分間遠心分離し、そして1%BSAおよび2mM EDTAを含むPBS(FACS希釈液)中に再懸濁させた。これらの細胞をカウントして 10^7 細胞/mlに調整し、そして0.1mlの細胞を、1 μ gの精製Mabと、100 μ lのFACS希釈液中4で30分間インキュベートした。このサンプルを洗浄し、0.1mlの希釈液中に再懸濁させ、1 μ gのヤギ抗マウスIgGのFITC結合体化F(ab')₂フラグメントと、4で30分間インキュベートした。この細胞を洗浄し、0.5mlのFACS希釈液中に再懸濁させ、そしてFACScan細胞選別機(Becton Dickinson, Mt. View, CA)を用いて分析した。

【0084】

抗体を、BUD株およびRED株に加えて、種々の他の細胞株への結合について、FACSによってスクリーニングした。これらは、以下を含む：RIN-MおよびRIN-Fラットインスリノーマ細胞株(Gazdar, A.F.ら(1980) Proc. Natl. Acad. Sci., 77: 3519-3523); ARIPラット腺房腫瘍細胞株(Jessop, N.W. および Hay, R.J. (1980) In Vitro, 16: 212); NODDマウス成体膵管細胞株(RED細胞について使用した方法と同じ方法を用いたが、成体NODマウス膵臓から開始することにより、本実験室において樹立した); BR516肺上皮細胞株(Roberts, P.E.ら(1992) Animal Cell technology: Basic and Applied Aspects, 335-341; Roberts, 3: L415-L425); ラット成体(ASC)および胚性(ESC)シュワン細胞株(Li, R.H.ら(1996) J. Neurosci. Methods, 67: 57-69)、RAT-1ラット線維芽細胞株(Botchan, M.ら(1976) Cell, 9: 269-287); TR-1ラット毛細血管内皮細胞株(Mather, J.P.ら、(1982) Annals of the New York Academy of Sciences, 383:44-68); TR-Mラット管周固筋様細胞株(Mather, J.P.ら(1982) Annals of the New York Academy of Sciences, 383:44-68)、および一次新生仔ラット心筋細胞培養物rCM(Lai, J.ら(1996) Am. J. Physiol., 271:H2197-H2208)。すべての細胞株を、10%ウシ胎仔血清(ARIP、RIN-F、RIN-M、RAT-1、TR-1、TR-M)またはその細胞株(BR516、NODD、ASC、ESC、rCM)に適切な、公開されたホルモン補充物を補充したF12/DMEM培地中に移した。

【0085】

実施例4. 免疫組織化学分析

妊娠9日目、10日目、12日目、15日目、または18日目のSprague Dawleyラットから取り出した後すぐに、胎子を液体窒素中で急速冷凍(snap-frozen)し、切片化するまで-70

10

20

30

40

50

で貯蔵した。4～6 μm厚の切片をクリオスタットでカットし、風乾し、アセトン中に5分間固定し、そして一晩風乾した。BUD細胞およびTR-1細胞の単層を、4%パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde) を用いて固定した。

【0086】

グルコースオキシダーゼ/グルコース方法 (AndrewおよびJasani, 1987) を用いて内在性のペルオキシダーゼをクエンチし、アビジン/ビオチンブロッキングキット (Vector, Burlingame, USA) を用いて内在性のビオチンをブロックし、そしてPBS/1%BSAを用いて(25分間) 内在性の免疫グロブリン結合部位をブロックした後、切片または細胞のいずれかに、精製Mab2160、2161、2115または2117 (PBS/1%BSA中、それぞれ、4.8 μg/ml、1.66 μg/ml、2.1 μg/mlおよび1.8 μg/ml) を2時間重層した。

10

【0087】

次に、サンプルを、ローダミン結合体化抗マウスIgG (Chemicon, Temecula, CA) またはビオチン-ラット抗マウスIgG1 (1:500) (Zymed, San Francisco, CA) と2時間インキュベートし、そしてペルオキシダーゼ結合体化ストレプトアビジン (4mg/ml) (Jackson, West Grove, FL) と30分間インキュベートした。PBS中で何回かリンスした後、免疫染色を3-アミノ-9-エチルカルバゾール (Dako, Carpinteria, CA) を用いて10～15分間発色させた。切片を、Mayerヘマトキシンで対比染色し、そしてグリセルゲル (glycergel) (Dako) に取り付けた。e9、e10、e12、e15、およびe18の胎仔の免疫組織化学分析を行う場合、2つの別々の実験を行い、そして各々のMabまたはコントロールに対して、各々の胎仔からの少なくとも4つの切片を検査した。

20

【0088】

腸を12.5日目のラット胎仔から解剖して取り出し、そして3%パラホルムアルデヒドで一晩固定した。洗浄、アセトンを用いた-20℃で7分間の透過処理、およびPBS/1%BSA/1%DMSO/2%ヤギ血清を用いる内在性の免疫グロブリン結合部位のブロック後、組織を、ウサギポリクロナール抗ラットPDX1 (1:1000) またはMab2160 (1:400) のいずれかと一晩インキュベートした。一晩のインキュベーションの後、二次抗体Cy3結合体化親和性精製ヤギ抗マウスIgGまたはウサギIgGのいずれかを用いて、免疫染色を分析した。

【0089】

実施例5. mRNAの単離および発現ライブラリーの構築

メッセンジャーRNAを、InVitrogen FastTrack 2.0 mRNA Isolation Systemを用いて、培養したBUD細胞から直接単離した。方向付けられたcDNA転写物を、Gibco-BRL Super Script Plasmid Systemを用いて、5mgのポリ-(A)⁺mRNAから調製し、そして5%アクリルアミド-TBEスラブゲルで分画した。溶出したcDNAを、哺乳動物発現ベクターpRK5DのXhoI-NotI部位に連結し、次いで製造業者により推奨される条件下で、Gibco-BRL DH10B細胞中にエレクトロポレートした。

30

【0090】

実施例6. 標的抗原をコードするcDNAクローンのパニングによる回収

BUD細胞ライブラリーのスクリーニングを、以前に記載された技術 (SeedおよびAruffo, 1987) の変更バージョンを用いて行った。手短には、cDNAライブラリーを、エレクトロポレーションによりCOS細胞にトランスフェクトした (Neumann, E.ら (1982) EMBO J., 7: 841-845)。

40

【0091】

培養の2日後; トランスフェクトしたCOS細胞を再懸濁させ、次いで表Iに示される抗体のプールと、それぞれ2mg/mlの濃度でインキュベートし、そして親和性精製したウサギ抗マウスIgGおよびIgMでコートしたディッシュ上に再プレートした。Hirt上清を、接着性の細胞から調製し、そしてコンピテントなEscherichia coliを形質転換するために使用した。増幅後、細菌のコロニーを収集し、次いでプラスミドcDNAをアルカリミニプレップ方法 (Birnboim, H.C. およびDoly, J. (1979) Nucleic Acids Research, 7: 1513-1523) により単離し、そして新たな回の免疫選択を行うためにCOS細胞にトランスフェクトした。プールした抗体を用いる3回のパニング後、次の回のパニングを、個々の精製Mabについ

50

て行った。

【 0 0 9 2 】

実施例 7. 遺伝子配列分析

ABI Dye - ターミネーターTM化学 (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) を、プライマーウオーキングストラテジー (Sanger, F.ら (1977) Proc. Natl. Acad. Sci., 74 : 5463-5467) を用いてクローン2160を配列決定するために使用した。この配列を、ABI377機器 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて回収した。両方のDNA鎖に対する異なるウオーキングプライマーにより生成した配列を編集し、そしてSequencherTM (Gene Codes Corp, Ann Arbor, MI) で構築した。データベース中のすべての配列分析を、社内の配列分析プログラム (Genentech Inc., South San Francisco, CA) を用いて行った。プログラムALIGN (Dayhoff, M. O.ら (1983) Methods Enzymol., 91: 524-545) を、クローン2160、mEGP、hEGP-1およびhEGP-2の間の関係を分析するために使用した。

10

【 0 0 9 3 】

実施例 8. 細胞溶解物の免疫ブロッティング

未処理Mab2160 (10 µg/ml)、またはP2160 (10 µg/ml) で処理したBUD細胞およびRED細胞のいずれかを、PBS/1%NP40/0.5%デオキシコレート/0.1%SDS/5mM EDTAに溶解し、そして溶解物を、4 ~ 20% Novex Tris-Glycineゲルにロードするか、または10mM Tris pH8.0、150mM塩化ナトリウム、1%デオキシコール酸ナトリウム、1% (v/v) triton-X-100、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、1mMロイペプチンおよび1mM PMSFを含む緩衝液に溶解させ、この溶解物を、抗ホスホ - Ser/Thr/Tyrモノクロナール抗体 (Clontech) またはMab2160で免疫沈降させ、煮沸し、そして4 ~ 12% Novex Tris-Glycineゲルにロードした。このゲルを、100 Vで電気泳動し、0.5 Ampで60分間、Protranニトロセルロース膜 (Schleicher and Schuell, Keene, NH) にエレクトロブロットした。

20

【 0 0 9 4 】

この膜を、PBS/5%脱脂乳/0.5% tween20/0.01%チメロサル (アッセイ緩衝液) 中で、室温で1時間ブロッックした。このブロットを、PBS/0.05%Tween20(PBST) 中で洗浄し、そしてそれぞれMab (1 µg/ml)、抗ホスホ - Ser/Thr/Tyrモノクロナール抗体 (Clontech) または臍臓のマーカーに対する抗体 (サイトケラチン7 (1:500)、PDX1 (1:500)、カルボキシペプチダーゼA (1:500) チロシンヒドロキシラーゼ (1:1000)) と1時間インキュベートした。この膜を、PBSTで洗浄し、1:5000希釈のヤギ抗マウスIgGまたは抗ウサギIgGペルオキシダーゼと、さらに1時間インキュベートした。この膜を十分に洗浄し、Amersham ECL化学発光システム (Amersham, Arlington Heights, VA) を用いて発色させた。

30

【 0 0 9 5 】

実施例 9. ノーザンブロット分析

示したヒト組織およびラット成体組織由来のポリ(A)⁺RNAブロットを、Clontech (Palo Alto, CA) から購入し、そしてランダムプライミング (random priming) (2×10^6 cpm/ml) (FeinbergおよびVogelstein, 1983) により標識化したクローン2160についての1.29Kb (32 P) dCTP cDNAプローブにハイブリダイズした。1時間のハイブリダイゼーションの後、膜を0.1 × SSC/0.1%SDSで65 °Cで洗浄し、70 °Cでオートラジオグラフィに供した。

40

【 0 0 9 6 】

実施例 10. 融合タンパク質2160(P2160)細胞外ドメイン (ECD)HIS-6の産生

特異的PCRプライマーを、タンパク質2160細胞外ドメインのDNA配列に基づいて合成した。親和精製の目的のために、HIS-6タグ配列を、各々のC末端プライマーに加えた。このp2160 ECD cDNAを、PCRにより生成させ、pRK5 (発現プラスミド) に、挿入されるcDNAの下流に位置するシミアンウイルス40 (SV40) 終端およびポリアデニル化シグナルとともにサイトメガロウイルスプロモーター/エンハンサーを用いて挿入した。これらの構築物を、ヒト胎児の腎臓293細胞にLipofectamineを用いて一過性にトランスフェクトした。この発現したタンパク質を、ニッケルを充填したキレート化セファロースカラム (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N. J.) を用いて精製した。タンパク質濃度を、OD280により決定した。

50

【 0 0 9 7 】

結果および考察BUD胎仔性膵管上皮細胞株およびRED胎仔性膵管上皮細胞株

2つの膵臓上皮細胞株を、解剖したラットe12胎仔性膵臓芽(BUD)およびラットe17管上皮(REN)の一次培養物からそれぞれ樹立した。この培養を開始し、上皮細胞の増殖について選択するために最適な無血清培地に移した。14F培地の各成分は、この細胞の最適な増殖に寄与する(表I)。これらの条件下、線維芽細胞および間葉細胞は培養物から2継代以内に消失し、残った細胞は均一に上皮細胞である。

【 0 0 9 8 】

この培養物は、BUD細胞およびRED細胞について、それぞれ11.4時間および14時間の対数期集団倍加時間を有する。この細胞は、接触抑制された単層を形成し、正常な核型を有し、そして細胞形態または増殖プロフィールにおける明らかな変化なしで、80集団倍加を超えて連続的に増殖している。この様式でげっ歯動物細胞株を樹立する以前の研究(Loo, D.ら(1989) J. Cell. Physiol., 139: 484-491; Roberts, P. E.ら(1990) Am. J. Physiol., 3: L415-L425)に従って、細胞の老化は観察されていない。

10

【 0 0 9 9 】

BUD細胞株およびRED細胞株をより特徴づけるために、膵臓の発達の初期段階に存在することが知られている種々のタンパク質の存在を、ウエスタンブロット分析により調べた(図1)。本発明者らは、BUD細胞、およびより少ない程度でRED細胞が、サイトケラチン7(MW 54kD)を発現し、これは、膵管上皮にのみ存在することを実証する(Bouwens, L.(1998) J. Pathol., 184: 234-239)。BUD細胞およびRED細胞は、カルボキシペプチダーゼA(35kD)(他の管マーカー(Kim, S. K.ら(1997) Development, 124: 4243-4252))を発現する。

20

【 0 1 0 0 】

プロカルボキシペプチドブチダーゼ(45kD)もまた、この2つの膵臓細胞株に存在する。膵臓BUD細胞株およびRED細胞株の両方はまた、インスリン遺伝子発現PDX1(42kD)についてホメオドメイン含有転写因子を発現し、PDX1は、マウスの膵臓の個体発生の中に、インスリンの前に出現する(Watada, H.ら(1996) Diabetes, 45: 1826-1831)。チロシンヒドロキシラーゼ(60kD)(初期島前駆体(Teitelman, G.およびLee, J. K.(1987) Dev. Biol., 121: 454-466)および管マーカー)は、BUD細胞、およびより少ない程度にRED細胞で検出された。

30

【 0 1 0 1 】

BUD/RED細胞表面タンパク質に対するモノクローナル抗体

インタクトな生存可能なBUD細胞およびRED細胞を使用して、マウスを免疫し、そしてモノクローナル抗体(MAb)を生成した。10のモノクローナル抗体を、RED細胞およびBUD細胞への結合に基づいて選択した(表IIA)。Mab2116、2117および2140は、TR-1内皮細胞株(Mather, J. P.ら(1982) Annals of the New York Academy of Sciences, 383: 44-68)と反応することが見出された。Mab2101、2103および2104はIgMであり、そして残りはIgGである。ウエスタンブロットに基づいて、これらのMAbによって認識される異なるタンパク質の分子量は、20kDaと120kDaとの間で変動する(表II)。Mab2103、2104、2140は、ウエスタンブロット分析には適切ではなかった。イムノブロットティングおよび交叉競合アッセイの結果は、MAb対2100/2101および2115/2116が、同じ抗原を認識することを示唆する。全ての他の抗体は、個別の抗原決定基を認識する。

40

【 0 1 0 2 】

異なるMAbによって標的化される抗原をさらに特徴づけるために、FACS分析を、種々の正常細胞株および腫瘍由来細胞株を用いて、生成された異なる抗BUD/RED MAbを使用して行った。予測されたように、BUD(図2A1)およびRED細胞は、生成された全てのMAbについて陽性である(表II)。免疫細胞化学は、染色が、天然の細胞表面であることを確認した(図2B)。選択された全ての抗体はまた、ある程度、成体非肥満糖尿病(NOD)マウス膵管上皮細胞に由来するNPDO細胞株と、そして正常新生児胚細胞株BR516(Roberts, P. E.

50

ら (1992) Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects, 335-341; Roberts, P. E.ら (1990) Am. J. Physiol., 3: L415-L425) と結合する。TR-1ラット内皮細胞株に結合した3つの抗体もまた、心筋細胞を除いて、試験した全ての細胞型に結合する(表II、図2A3、A4)。これらの結果は、TR-1細胞についての免疫細胞化学の結果と一致する(図2C)。

【0103】

対照的に、MAb2100/21、2103、2104、2160および2161は、より特異的であり、そして試験した他の細胞型(いくつかのインスリノーマおよび腺房腫瘍由来細胞株(RIN-M、RIN-F、APIP)を含む)のほとんどに結合しない(表II、図2A)。

【0104】

(膵臓の発達の初期段階での消化管に沿ったAg2101、PDX1およびAg2160の免疫局在化) BUD細胞およびRED細胞に指向されるMabをまた使用して、胚性ラット膵臓を用いて免疫組織化学を行った。e12ラット胚のMAb2100での染色は、この段階での抗原2101の膵臓特異性を明らかにした(図3A)。消化管のこの領域を横切る区画のみが、膵臓芽での強力かつ特異的な染色を提示した。肛門領域において可視化された非特異的シグナルは、第1抗体を用いずに、またはマウスアイソタイプIgGを用いて、コントロールに存在した。

【0105】

e12.5ラット胚性消化管に沿った免疫反応性もまた、MAb2160(図3C)を用いて研究し、そしてウサギポリクローナル抗ラットPDX1を使用して可視化した染色と比較する(図3B)。PDX1免疫反応性は主に、背側膵臓で、そして消化管に沿って限定された面積のレベルで、見られた。より弱いシグナルもまた、腹側膵臓において観察された。MAb2160は、胃の下部から膵臓の腹側膨出まで、腹側細胞層に沿って、強力に反応性であった。強力なシグナルもまた、背側膵臓において、およびより少ない程度で腹側膵臓管において、発達する管に沿って可視化された。

【0106】

さらなる免疫組織化学(IHC)研究

胚発生の際の種々の抗原の発現をより良く特徴づけるために、e9~e18日目のラット胚および成体膵臓のIHC分析を、抗BUD/RED MAbを用いて、行った。これらの分析に基づいて、膵臓上皮細胞株に対して惹起されたMAbは、ほぼ2つの群に分けられ得る。一方の群(MAb2100/01、2103、2104、2160および2161を含む)は、胃腸管の上皮細胞および他の外胚葉に由来する上皮(例えば、肺および腎臓)にて特異的に標的化し、一方、他方の群(MAb2115/16、2117および2140を含む)は、前述の上皮細胞に加えて、内皮細胞およびニューロン細胞に結合する(データ示さず)。興味深いことに、異なる抗BUD/RED MAbは類似の器官(例えば、感覚毛部位および直腸)を染色し、一方、器官内で染色された細胞型は、多くの場合、非常に異なっていた。このことは特に、MAb2117、2160、2161および2115による感覚毛部位の染色を比較することによって、十分例示される(図4)。

【0107】

e9ラット胚において(図5A)、MAb2160によって認識されるタンパク質は、内臓内胚葉に対応する細胞の層に明確に存在する。胚外内胚葉のレベルでの弱い染色もまた、観察された。e10ラット胚(図5B)において、内臓および壁内胚葉が染色された。発生のe12、e15およびe18日目(図5C~E)で、複数の器官の上皮もまた染色された。MAb2160は、e12で、嗅覚洞、肺、腸および結腸中の上皮細胞と強力に反応性であった。これらの構造は、e15およびe18でなお陽性であった。e15にて、陽性シグナルはまた、発生中の耳および膵臓の上皮で検出された。嗅覚洞、口腔、舌、咽頭および気管を覆う重層の上皮は、e18胚において中程度から強力な染色を示した(図5E)。

【0108】

顎下腺および胸腺もまた、染色された。弱から中程度の免疫反応性が、肺、肝臓および腎臓の上皮において観察された。小腸および大腸の上皮内層、ならびに膀胱および尿道の上皮もは、強力に反応性であった。18~20日目にて、明確な染色が、耳(図5F)、感覚毛部位(図4B)および直腸を含む肛門管(図5G)における上皮細胞の膜上に観察された。非

10

20

30

40

50

常に強力～中程度の染色が、発生中、ならびに成体の膵臓（図5H）の管上皮において検出された。成体膵臓の腺房細胞は、ほとんどまたは全く染色を示さず、そして特異的なシグナルは、島の周囲のいくつかの細胞を除いて、成体膵臓の島においては観察されなかった（図5H）。研究したいずれの年齢でも筋肉、骨格もしくは神経の組織において、染色は観察されなかった。

【0109】

Mab2117によって認識される抗原の発現もまた、詳細に試験されている。e9ラット胚自体では染色は検出されなかった。しかし、Mab2117によって認識されるタンパク質は、子宮内膜内層において豊富に発現される（図8A）。非常に強度が高いかまたは中程度の染色もまた、子宮腸間膜における大神経線維およびより小さな小動脈の周囲の小神経線維において、それぞれ観察された（データは示さず）。e10ラット胚において、中程度の染色が、脊索において観察され、そして底板における染色は証明されなかった（図8B 1～2）。弱い染色は、子宮中皮において検出可能であった。

10

【0110】

後期発生段階において、現れた脊索は、e11ラット胚において強度に染色され、そして底板は、中程度に染色された（図8C）。さらに、中程度の染色が、背側の前方神経管に対して外側の分散した細胞集団において観察された。Mab2117は、心臓、肺および脊索中の細胞と強力に反応性であった（図8D）。e12ラット胚（図8E）およびe18ラット胚（図8F）において、Ag2117は、より広範に分布し、そして脊髄のようなニューロン構造、脊髄神経節、脳におけるいくつかの構造、舌、膵臓および他の器官における神経に存在するが、嗅上皮、咽頭、気管、顎下腺、胸腺、肺、膵臓、膀胱および直腸における上皮細胞にも存在する。染色はまた、心臓および肝臓において観察される。

20

【0111】

成体ラットにおいて、Mab2117染色は、脳、膵臓および腎臓において観察された（図9）。脳において、強い染色が、分界条の線維とともに、尾状被殻において（図9A2）、脳弓下器官および交連下（subcommisural。心室上皮においては染色は観察されなかった。膵臓において、管および腺房の上皮細胞におけるAg2117について、強力な染色が検出された。Mab2117もまた、膵臓における神経と強力に反応性であり、そして島においてシグナルは観察されなかった（図9B）。腎臓において、腎盤の尿上皮において強いシグナルが存在する（図9C1）。傍系球体装置はまた、強力に染色された系球体外メサングウム細胞に特異的に、陽性として現れた（図9C2）。腎臓皮質において、遠位曲尿細管は、Mab2117と反応した。

30

【0112】

（抗原をコードする遺伝子のクローニング）

これらのMab全てが細胞表面抗原の天然の配置を認識したので、これらの抗体を、発現クローニング手順において使用して、表面抗原をコードする遺伝子を単離した。cDNAライブラリーを、BUD細胞から調製し、そしてCOS細胞において発現させた。次いで、抗体を使用して、目的の細胞表面分子を発現する細胞について「パニング」した。個々のクローンを、5～8回のパニングの後に得た。これは、10個の抗体のプールで開始し、続いて、3回目までに個々の抗体を使用した。

40

【0113】

高効率COS細胞発現系を使用して、本発明者らは、精製し、配列決定し、そしてMab2160およびMab2117によって認識される抗原をコードするcDNAクローンを発現させた。抗原2160（Ag2160）および2117（Ag2117）をコードする遺伝子を過剰発現するCOS細胞は、FACSによって分析した場合、対応するMabの高レベルの結合を示した。偽トランスフェクトしたCOS細胞への特異的な結合は、観察されなかった。

【0114】

Ag2160およびAg2117をコードするcDNA配列

Ag2160をコードするDNA配列（図6Aに示す）は、35kDaの分子量を有する315アミノ酸のオープンリーディングフレームであると予測され、これは、評価した分子量と一致する（

50

表IIA)。予測したタンパク質の疎水性プロットは、内在性膜タンパク質を示唆する(図6B)。11の疎水性アミノ酸の推定シグナル配列は、配列コアに見出される。シグナルペプチダーゼ切断部位は、Glu-Lys-Asp配列の前であるので(von Heijine, 1986)、Ag2160細胞外ドメインは、243アミノ酸を含む。タンパク質のシステインリッチ細胞外ドメインは、アスパラギン111および198で2つの潜在的なN結合型グリコシル化部位(NXT/S)を含み、これは、ウエスタンブロットングによって検出される40kDaと50kDaとの間の幅広いバンドを説明し得る。Ag2160を、疎水性の23アミノ酸配列によって膜に係留する。個の配列が、高度に荷電した26残基の細胞質ドメインからこの細胞外ドメインを分離する。

【0115】

MAb2160によって認識される抗原は、マウスpan - 上皮糖タンパク質(mEGP)およびヒトpan - 上皮糖タンパク質(hEGP-1, hEGP-2)に相同である。アミノ酸配列の比較は、アミノ酸レベルでmEGPとの約93%の相同性、および核酸レベルで88%の相同性を示す(Bergsa gel, P. L.ら(1992) J. Immunol., 148: 590-596)。同様に、Ag2160アミノ酸配列は、アミノ酸レベルで、hEGP-2との約88%の相同性(Strnad, J.ら(1989) Cancer Res., 49: 314-317)およびhEGP-1との63%の相同性(Linnenbach, A. J.ら(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 27-31)を共有する。Ag2160とEGPとの間の最高の相同性は、12システイン残基、2つの潜在的なN結合型グリコシル化部位、シグナルおよび膜貫通配列の領域である(図6C)。

【0116】

2125bpの部分的cDNAクローンを、「パニング」プロトコルにおいてMAb2117を使用して精製した(図10)。Ag2117の推定配列は、ラット造血抗原(HCA)(これは、ニワトリ神経接着分子BEN/SC-1/DM-GRASPのラットホモログである)に約100%相同である。ニワトリBENのラットホモログの推定アミノ酸配列は、いくつかのグリコシル化部位の存在を明らかにし、これはおそらく、推定分子量65kDと、MAb2117を使用してウエスタンブロットにおいて観察された97kDの分子量との間の差異を説明する(図10D)。

【0117】

ヒトにおけるAg2160およびAg2117 mRNAの組織分布

Ag2160 mRNAの発現を、ノーザンブロットにより種々の正常ヒト成体組織において、全長cDNAクローン2160を用いて分析した。1.7kbのAg2160 mRNAの発現が、膵臓、腎臓、肺、小腸、結腸、胸腺において、およびより少ない程度で、胃および気管において検出された(図6D)。これは、ラット胚におけるIHCで見られた抗原の分布と良好に一致する。筋肉、骨格および神経組織においてシグナルは検出されなかった。

【0118】

ノーザンブロット分析も、全長2117 cDNAを含むプローブを用いて行った。正常ヒト組織において、高~中程度のレベルのAg2117 mRNA(5kb)の発現が、膵臓、腎臓、肝臓、肺、胎盤、脾臓、前立腺、卵巣、小腸、結腸、胃、胸腺および気管、ならびに神経系(脳および脊髄を含む)の組織において検出された(図11)。これらの結果は、ラット胚切片およびラット成体組織切片を用いて行われた免疫組織化学的分析の結果と一致する。さらに、Ag2117 mRNAについてヒト心臓においてシグナルは検出されなかった。このことは、胚心臓において観察された発現が一過性であり得ることを示唆する。

【0119】

MAb2160および融合タンパク質P2160の生物学的活性

Ag2160の生物学的役割を理解するために、本発明者らは、HIS-6タグにAg2160細胞外ドメインを連結した融合タンパク質(P2160と呼ぶ)を構築し、発現させ、そして部分的に精製した。次いで、本発明者らは、MAb2160およびP2160の生物学的活性をインビトロおよびインビボで試験した。対応する抗原を発現する細胞に対するこれらの試薬のインビトロでの効果を試験するために、BUD細胞を、漸増濃度のMAb2160、P2160、または非関連コントロール抗体もしくはコントロールHISタグ化タンパク質の存在下で、培養した。5日間の培養の後、細胞をトリプシン処理し、そして細胞数および体積を決定した。

【0120】

10

20

30

40

50

図7に示すように、Mab216細胞での処置は、BUD細胞増殖の用量依存性阻害、ならびに細胞体積における用量依存性増加を生じた。Mab2160の阻害効果は、1 μ g/mlほど(6.25nM)のMab2160を使用したときに観察された。Mab2160の最大の効果は、10 μ g/mlの抗体を適用したときに検出された(すなわち、33%の増殖阻害およびBUD細胞体積の12%の増加)。Mab2160は、TR-1細胞増殖に対しても体積に対しても何の効果も有さず、このことは、FACS分析におけるMab2160の結合の欠如と一致した。さらに、100 μ g/mlまでの濃度の非関連コントロール抗体の存在下での5日間のBUD細胞の培養は、細胞増殖または細胞体積のいずれに対しても効果を有しなかった。

【0121】

同様に、BUD細胞を、漸増濃度のp2160の存在下でプレートした。P2160の存在下におけるBUD細胞の培養はまた、細胞増殖の用量依存性阻害を生じた。増殖を阻害するに必要なP2160の最低濃度は、1 μ g/ml(28.6nM)であった。細胞の増殖の劇的な阻害(約70%を超える)および細胞体積における増加(約7%)が、100 μ g/mlのP2160を培養培地に添加したときに観察された。Mab2160によって媒介される効果と同様に、増加した細胞体積は、P2160での処置の後の細胞数における減少と相関した。BUD細胞の数または体積は、コントロールHIS-6融合タンパク質の添加によって影響されなかった(図7B)。

【0122】

BUD細胞の増殖および体積に対するMab2160およびP2160の効果を考慮すると、Ag2160は、タンパク質の細胞質ドメインおよび/または他の関連する細胞質タンパク質のタンパク質リン酸化における変化を通じて合図し得る可能性があるようである。リン酸化状態に対する、Mab2160またはP2160のいずれかでのBUD細胞の処置の影響を決定するために、コンフルエントな細胞培養物を溶解し、抗ホスホ-Ser/Thr/Tyr MAbまたはMab2160のいずれかで免疫沈降し、ゲル電気泳動で分離し、トランスファーし、そして抗ホスホ-Ser/Thr/Tyr MAbでイムノプロットした。図6Cに示すように、細胞のMab2160での2時間の処理は、50 kDのリン酸化タンパク質の出現を生じた。

【0123】

このタンパク質のリン酸化は、チロシンにおいて生じる。なぜなら、対応するバンドがまた、膜を抗ホスホチロシンMAbでプローブした場合に存在するからである。リン酸化タンパク質の免疫沈降後に、細胞を融合タンパク質P2160で2時間処置した場合、リン酸化レベルにおいて有意な変化は見られなかった。しかし、100kDのリン酸化タンパク質の出現および28kDのタンパク質のリン酸化の減少が、P2160処理細胞溶解物を、Mab2160で免疫沈降した場合に、観察された。特異的抗P-tyrでの並行免疫標識は、100kDのタンパク質が、セリンまたはスレオニンにおいてリン酸化され、そして28kDのタンパク質は、チロシンにおいてリン酸化されることを示唆する。さらに、免疫沈降したAg2160自体は、チロシンにおいてリン酸化されるようである。

【0124】

まとめると、本発明者らは、膵臓分化の初期段階から2つの細胞株を樹立した。これらの細胞株は、マーカータンパク質を発現し、このタンパク質には、胚性膵臓上皮細胞に特徴的な、サイトケラチン7、PDX1、カルボキシペプチダーゼA、チロシンヒドロキシラーゼが含まれる。証拠の大体は、これらの初期上皮細胞が、最終的に成体膵臓における管、島および腺房の細胞を生じることを示唆する(Debasら(1997) Am. J. Surg. 174: 227-231)。無血清培地において樹立されたこれらの細胞株は、本発明者らが、e12.5の胚の膵臓上皮細胞および発性に関連する器官の上皮を特異的に認識する抗体を惹起することを可能にした。

【0125】

このストラテジーを使用して、本発明者らは、本明細書中に示される10のMAbを含む15より多いMAbを作製し、これらは、発生学的に関連しない細胞(例えば、中胚葉に由来する組織)に対する最小交叉反応性を有する細胞表面タンパク質に特異的であった。本発明者らがこれらの方法を用いて惹起したMAbの全ては、表面抗原の細胞外ドメインを認識する。さらに、これらのMAbは、好ましくは、凍結組織およびその切片において保存される

10

20

30

40

50

ように、それらのネイティブな配置を示す抗原に結合する。本発明者らが作製した多くの M a b は、ウエスタンブロットにおいて固定化された変性抗原を認識しない。

【 0 1 2 6 】

実施例11. 種々の細胞免疫原の比較分析

例示のために、このセットの実験は、無血清培地において培養された生存可能およびインタクトな細胞が、免疫に使用される細胞の型を示す細胞表面抗原に結合し得るモノクローナル抗体の生成の際に、血清を補充した培地において培養された細胞よりも、良好な免疫原であることを実証する。

【 0 1 2 7 】

この研究において、ラット脊髄神経節に由来する成体Schwann細胞 (rASC) を、免疫原として使用した。米国特許第5,721,139号、米国特許第5,714,385号およびLi, R. (1997) *Endocrinology*, 138: 2648-2657に詳述される手順に従って、rASCを単離し、そして無血清培地において増殖させた。Balb/cマウスを、腹腔内 (ip) または肢掌 (foot pad:fp) のいずれかで、無血清培地または血清補充培地において増殖させた約 $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ のインタクトなrASC細胞で免疫した。

10

【 0 1 2 8 】

数回の追加免疫の後、ハイブリドーマを、約35% ~ 約50%のポリエチレングリコール4000を用いて、マウス脾臓 (腹腔内 (interperitoneally) に接種されたマウスの群について) またはマウスリンパ節 (肢掌に接種されたマウスの群において) からのリンパ球を骨髓腫株X63-Ag8.653と融合することによって生成した (Oi, V. およびHerzenberg, L. (1980)

20

「Immunoglobulin-Producing Hybrid Cell Lines」)。ほぼ等しい数のハイブリドーマクローンを、血清を補充した培地または血清を補充していない培地で増殖させた r A S C 細胞で腹腔内に免疫したマウスの2つの部分群から得た。しかし、4倍多くの陽性のハイブリドーマクローンが、無血清培地を免疫原として使用した場合に、rASC細胞の表面抗原に対するモノクローナル抗体を産生することが見出された。

【 0 1 2 9 】

表1に示すように、FACS分析によって決定した場合、血清培養rASC細胞で免疫したマウスから産生されたハイブリドーマのわずか3%が、インタクトなrASC細胞と反応性のモノクローナル抗体を分泌したのに対し、無血清rASC細胞を注射したマウスから得たハイブリドーマの12%は、インタクトなrASC細胞への特異的結合を示すモノクローナル抗体を産生する (FACSに関する詳細な実験手順については、実施例3を参照のこと) 。同様に、陽性ハイブリドーマクローンのパーセンテージにおける2倍の差異が、同じ免疫原での肢掌の免疫を受けたマウスの群において観察された (表1) 。明確には、表面が無血清である細胞は、接種の経路にかかわらず、表面抗原に結合し得るモノクローナル抗体の作製の際に、より効果的である。

30

【 0 1 3 0 】

【表 1】

表 1

状態	10%のウシ胎仔血清を補充した培地で培養されたrASC細胞での腹腔内免疫化 (アジュバントなし)	無血清培地で培養されたrASC細胞での腹腔内免疫化 (アジュバントなし)	10%のウシ胎仔血清を補充した培地で培養されたrASC細胞での肢掌免疫化 (アジュバントなし)	無血清培地で培養されたrASC細胞での肢掌免疫化 (アジュバントなし)
ハイブリドーマクローンの総数	460	480	64	34
陰性ハイブリドーマクローンの総数	448	442	64	33
陽性ハイブリドーマクローンの総数	12	58	1	1
陽性ハイブリドーマクローンのパーセンテージ	3%	12%	1.5%	3%

10

【 0 1 3 1 】

ハイブリドーマクローンの総数は、骨髄腫細胞X63-Ag8.653とのリンパ球の融合により生成されたハイブリドーマクローンの合計を表す。FACS分析により決定したようなインタクトな固定されていないrASC細胞に結合し得るモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマクローンを、「陽性ハイブリドーマクローン」と示す。結果として、抗体を産生できないか、またはFACS分析においてインタクトなrASC細胞を結合し得ないモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを、「陰性ハイブリドーマクローン」として分類する。

20

【 0 1 3 2 】

実施例12. 細胞表面抗原と反応性のモノクローナル抗体を生成する際のアジュバントの効果

本発明者らはまた、細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体の産生におけるアジュバントの効果を試験した。3群のマウスを、この研究に使用した。おのおのは、成体ラットSchwann細胞 (rASC)、成体ヒトSchwann細胞 (hASC) または胚性ヒトSchwann (hESC) 細胞で、アジュバントRibiを伴ってかまたは伴わずに免疫した。実施例10に示した先の実験と同様に、これらのSchwann細胞株を、米国特許第5,721,139号、米国特許第5,714,385号およびLi, R. (1997) Endocrinology, 138: 2648-2657に開示された方法に従って樹立した。ハイブリドーマの産生および分泌もまた、上記のように行った。

30

【 0 1 3 3 】

3つ全ての群のマウスについて、本発明者らは、Ribiと混合された細胞免疫原に供されたマウスのリンパ球を融合することによって得られたハイブリドーマクローンの総数において、数倍の増加を観察した。本発明者らはさらに、免疫に使用したインタクトなSchwann細胞と反応性のモノクローナル抗体を産生する陽性ハイブリドーマクローンのパーセンテージにおける、10倍の増加に注目した。従って、Ribiのようなアジュバントの使用は、細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体の収率を、非常に増加させる。

40

【 0 1 3 4 】

【表 2】

表 2

細胞	Ribiなしで 注射した rASC細胞	Ribiとともに 注射した rASC細胞	Ribiなしで 注射した hASC細胞	Ribiとともに 注射した hASC細胞	Ribiなしで 注射した hESC細胞	Ribiとともに 注射した hESC細胞
ハイブリド- マクロンの 総数	34	187	29	72	85	216
陰性ハイブリド- マクロンの 総数	33	110	29	65	84	194
陽性ハイブリド- マクロンの 総数	1	77	0	7	1	22
陽性ハイブリド- マクロンの パーセンテージ	3%	41%	0%	10%	1%	10%

生成されたハイブリド-マクロンの総数は、リンパ球を骨髄腫細胞X63-Ag8.653と融合することによって生成されたハイブリド-マクロンの合計を表す。FACS分析により決定したようなインタクトな固定されていない細胞免疫原に結合し得るモノクローナル抗体を分泌するハイブリド-マクロンを、「陽性ハイブリド-マクロン」と示す。結果として、抗体を産生できないか、または免疫において用いたインタクトな細胞を結合し得ないモノクローナル抗体を分泌するハイブリド-マクロンを、「陰性ハイブリド-マクロン」として分類する。

【図面の簡単な説明】

【 0 1 3 5 】

【図 1】図 1 は、膵臓の発達の初期段階に発現されることが既知であるタンパク質に対する抗体を使用してBUD細胞およびRED細胞より調製した細胞溶解物の免疫プロットである。約100 μgのタンパク質を、4 ~ 20%のSDS - ポリアクリルアミド勾配ゲルによって分離し、そしてマウスモノクローナル抗ヒトサイトケラチン7 (1/500)、ウサギポリクローナル抗ラットPDX1 (1/500)、ウサギポリクローナル抗ウシカルボキシペプチダーゼ A (1/500) またはウサギポリクローナル抗ラットチロシンヒドロキシラーゼ (1/1000) を用いて免疫プロットした。

【 0 1 3 6 】

【図 2】図 2 (A) は、モノクローナル抗体 (MAb) 2160 (赤)、モノクローナル抗体 (MAb) 2161 (青) およびモノクローナル抗体 (MAb) 2115 (オレンジ) を使用したBUD細胞、TR-1細胞、RIN-F細胞およびASC細胞のFACS分析の結果を示す。コントロール (緑) は、2次抗体を有しない。MAb2160、MAb2161およびMAb2115を用いたBUD (B) 細胞およびTR-1 (C) 細胞の免疫蛍光染色もまた示す。

【図 3】図 3 は、ラット胚の腸に沿ったAg2101、PDX1およびAg2160の免疫局在性を示す。12日目のラット胚の凍結切片を、MAb2101で染色した。矢印は、膵臓芽 (pancreatic bud) における染色を示す (A1 ~ 2)。ウサギポリクローナル抗ラットPDX1 (B1 ~ 2) およびMAb2160 (C1 ~ 2) を用いた解剖された12.5日ラット胚内臓の染色もまた示す。

【 0 1 3 7 】

【図 4】図 4 は、MAb2117 (A)、MAb2160 (B)、MAb2161 (C) およびMAb2115 (D) を用いた、18日ラット胚感覚毛部位 (vibrissa) 由来の凍結切片の染色を示す。この構造は、4つの抗体全てによって認識されるが、各々のモノクローナル抗体は、感覚毛部位内の異なる細胞のサブセットを染色することに注意すること。

【図 5】図 5 (A ~ E) は、MAb2160を使用した9、10、12、15、または18日のラット胚由来の凍結切片の染色を示す。MAb2160染色を、感覚毛部位、嗅上皮 (OE)、耳 (E)、

10

20

30

40

50

顎下腺、咽頭、肺（L）、膵臓（P）、腸管（I）、膀胱、および直腸（R）における上皮細胞において観察した。より高い倍率は、e20ラット胚の耳（F）、直腸（e18）（G）、および成体膵臓（H）の染色を示す。（H）において、Mab2160染色を、膵島細胞ではなく、管上皮組織において検出した。

【0138】

【図6】図6のパネルAは、Ag2160の完全なDNA配列および推定アミノ酸配列を示す。ヌクレオチドの番号付けを配列の右に示し、そしてアミノ酸の番号付けを配列の左に示す。予測された配列は、可能なシグナル配列（黒の罫線）、2つの潜在的なN連結グリコシル化部位（グレーの罫線）、および単一の23アミノ酸膜貫通ドメイン（グレーの枠）を示す。パネルBは、推定アミノ酸配列のKyte-Doolittleプロットである。推定開始コドンおよび停止コドンもまた示す。推定疎水性シグナルペプチドならびに疎水性膜貫通ドメインを下線した。パネルCは、mEGP、hEGP-2、hEGP-1を含むAg2160ホモログの配列アラインメントである。疎水性シグナルペプチドおよび疎水性膜貫通ドメインに下線を付した。タンパク質配列を、I型サイログロブリン配列反復（枠で囲まれる）と整列させた。保存されたシステイン残基は太字であり、と同時に高度に保存された領域を示した。パネルDは、Ag2160 mRNAの組織分布を示すノーザンプロットである。

10

【0139】

【図7】図7のパネルAは、MAB2160によるBUD細胞の増殖の阻害を示す。BUD細胞は、プレートされ、そして0~100 μg/mlのMAB2160（黒、丸）、または関連しないAb（白、三角）を添加して5日培養した（A）。5日目に、細胞数および量を測定した。パネルBは、融合タンパク質P2160によるBUD細胞の増殖の阻害を示す。細胞を、0~100 μg/mlのP2160（黒、丸）、またはHIS-6タグを有する関連しない融合タンパク質（白、三角）を有り無しで培養し、そしてAにおけるように分析した。

20

【0140】

各々の値は、独立した実験（それぞれ3連で行う** P < 0.01 ; *** P < 0.001）3（A）または2（B）の平均 ± S E Mを示す。パネルCは、MAB2160（10 μg/ml）またはP2160（10 μg/ml）を用いて処理したBUD細胞から調製した免疫沈降の免疫プロットを示す。処置の2時間後、BUD細胞を溶解し、そして免疫沈降を、抗リン酸 - Ser/Thr/Tyr（IP P-Ser/Thr/Tyr）抗体、またはMAB2160（IP Ag2160）を使用して調製した。抗P-Ser/Thr/Tyr免疫沈降からのタンパク質をMab2160を用いてプロットし（左パネル）、抗Mab2160免疫沈降からのタンパク質を抗P-Ser/Thr/Tyr抗体を用いてプロットした。

30

【0141】

【図8】図8は、MAB2117を使用した、9、10、12、15または18日のラット胚由来の凍結切片の染色を示す。

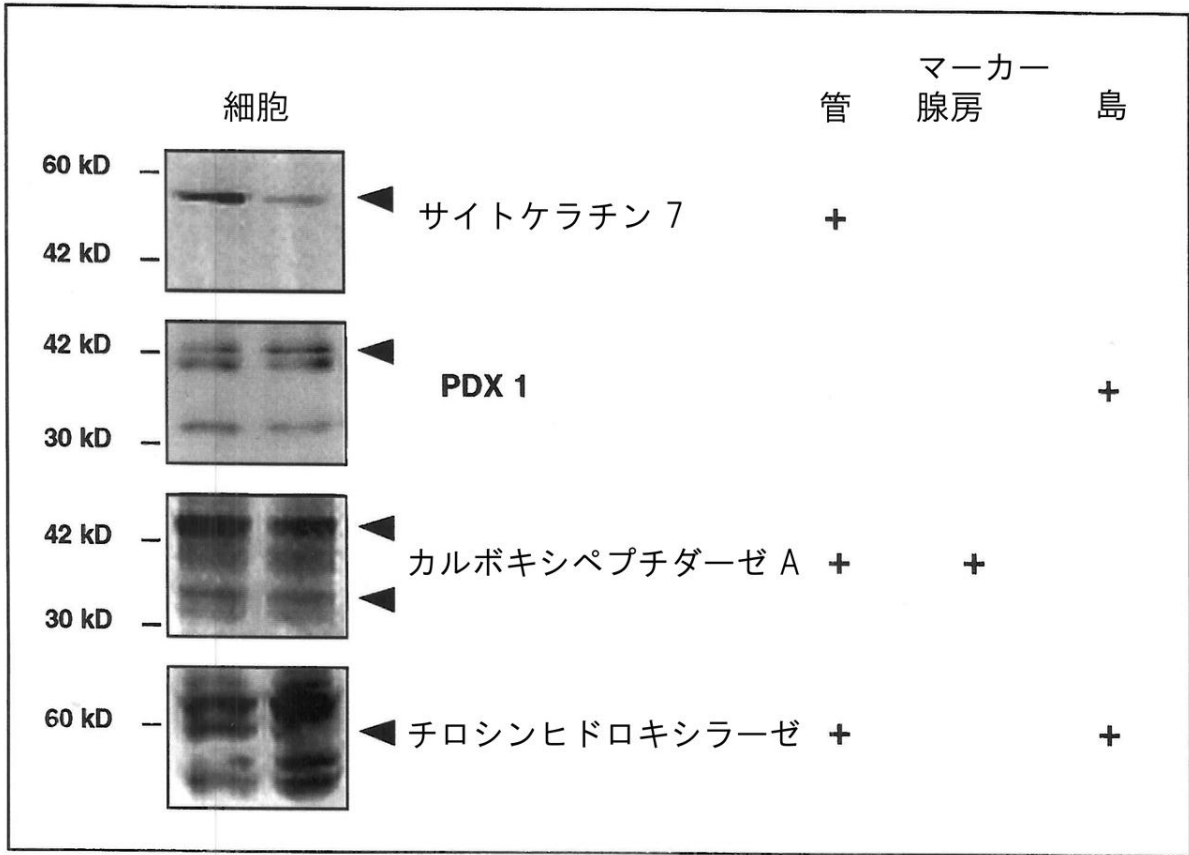
【図9】図9は、成体ラットMAB2117由来の凍結切片の染色を示す。

【図10】図10は、Mab2117によって認識されるAg2117の部分的なcDNAクローンを示す。

【図11】図11は、Ag2117 mRNAの組織分布を示すノーザンプロットである。

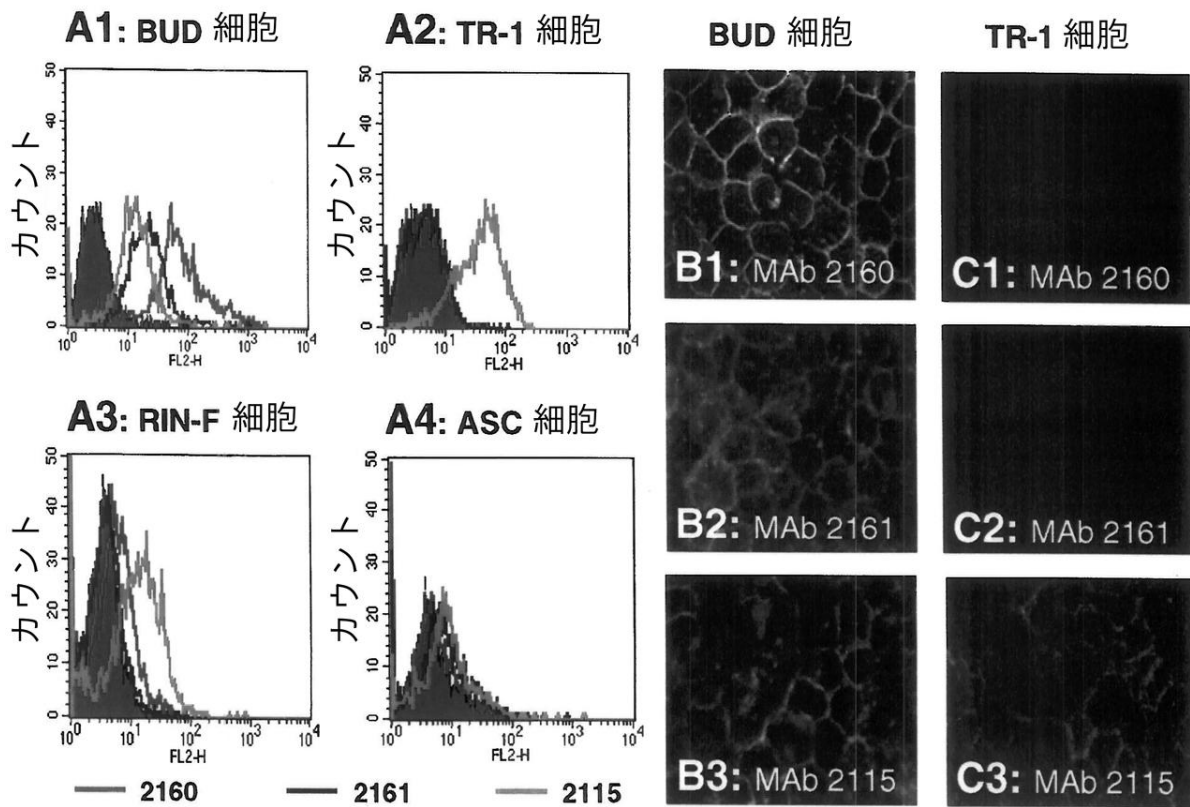
【図1】

図1



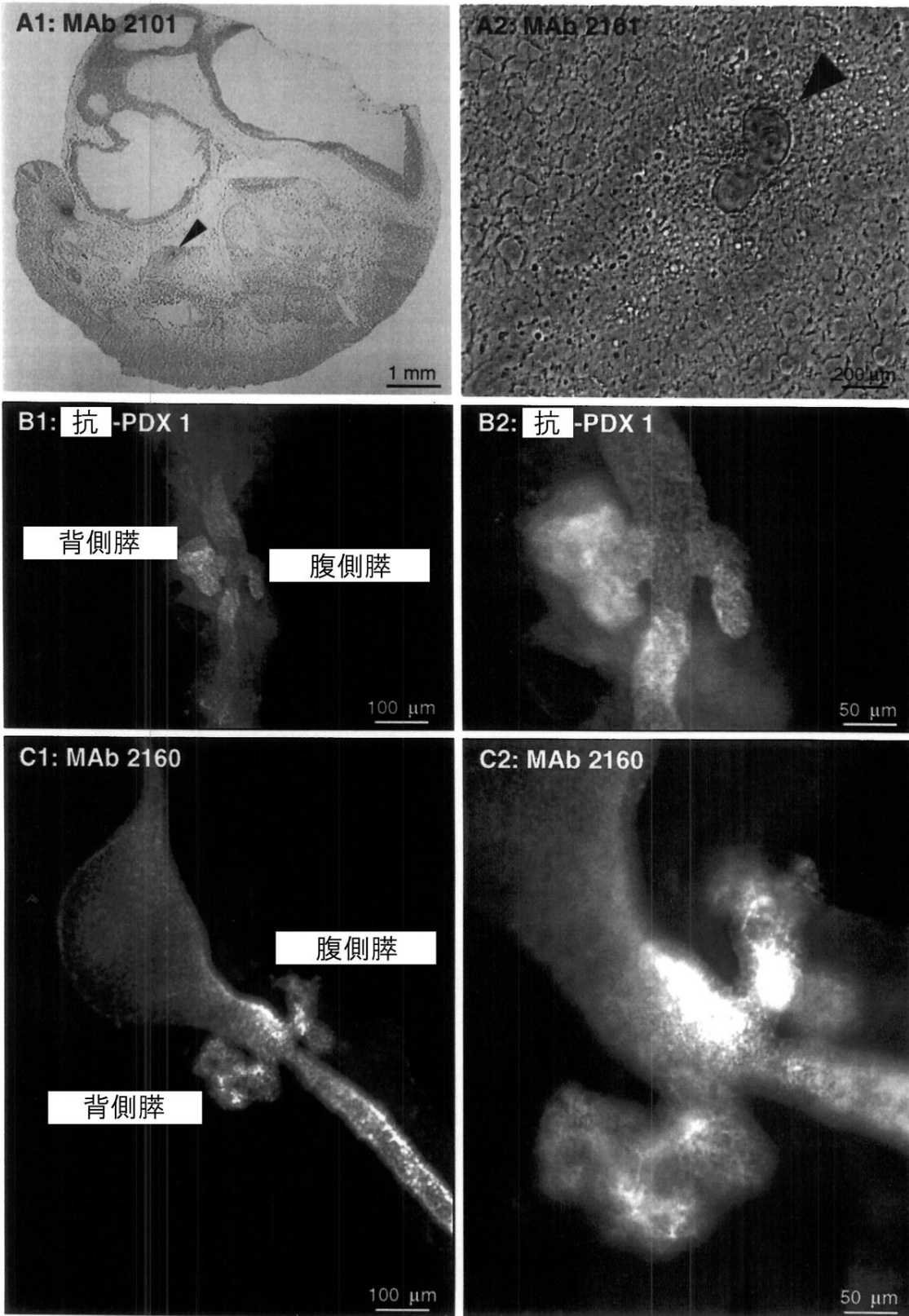
【図2】

図2



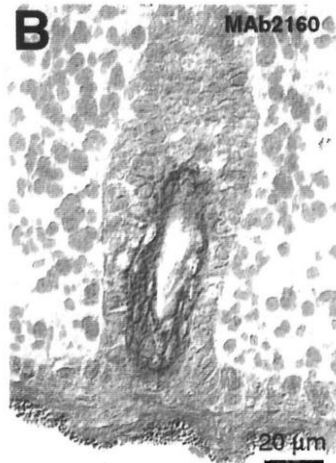
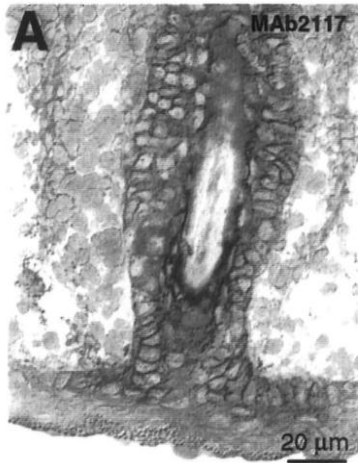
【 図 3 】

図3



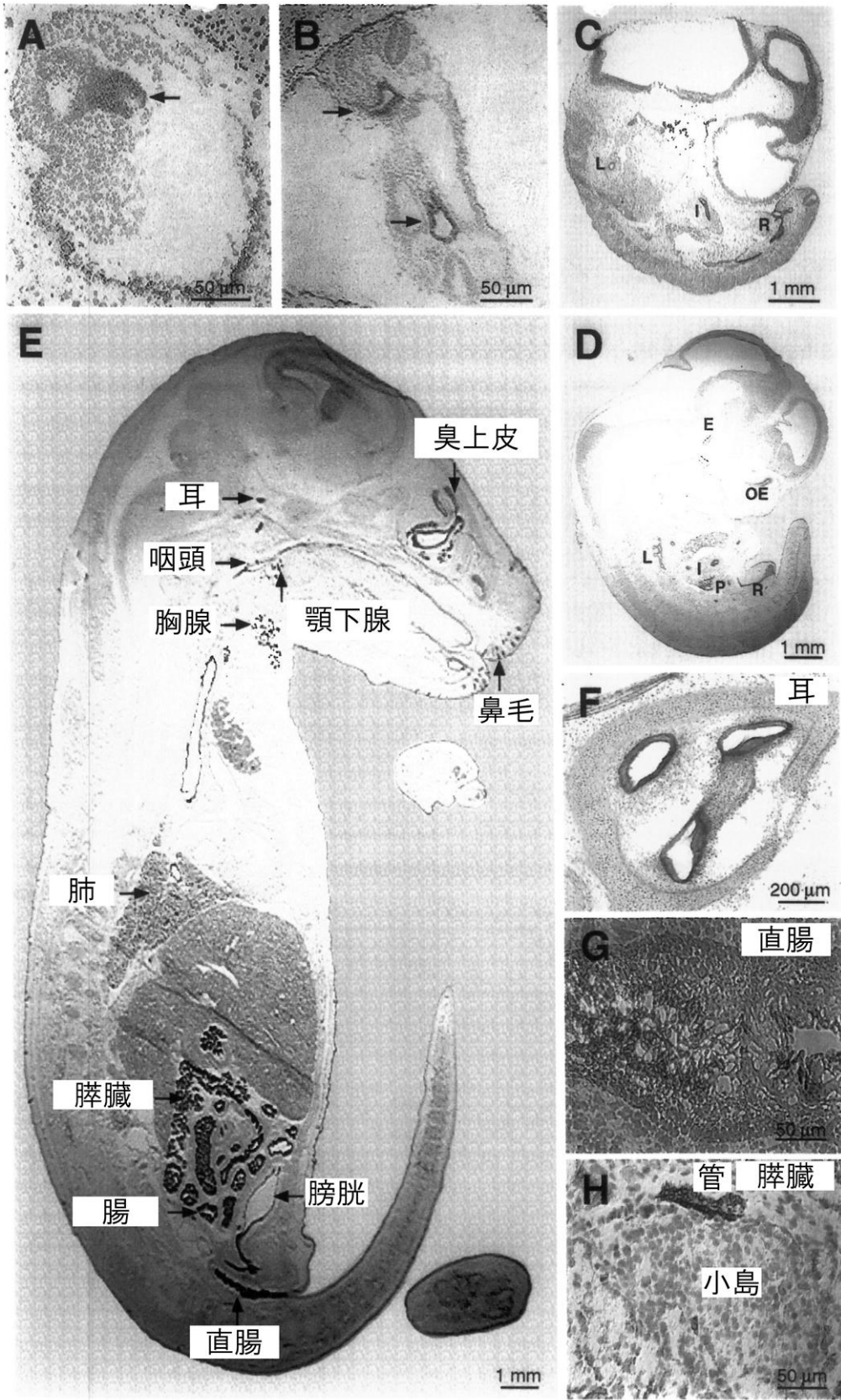
【 図 4 】

図4



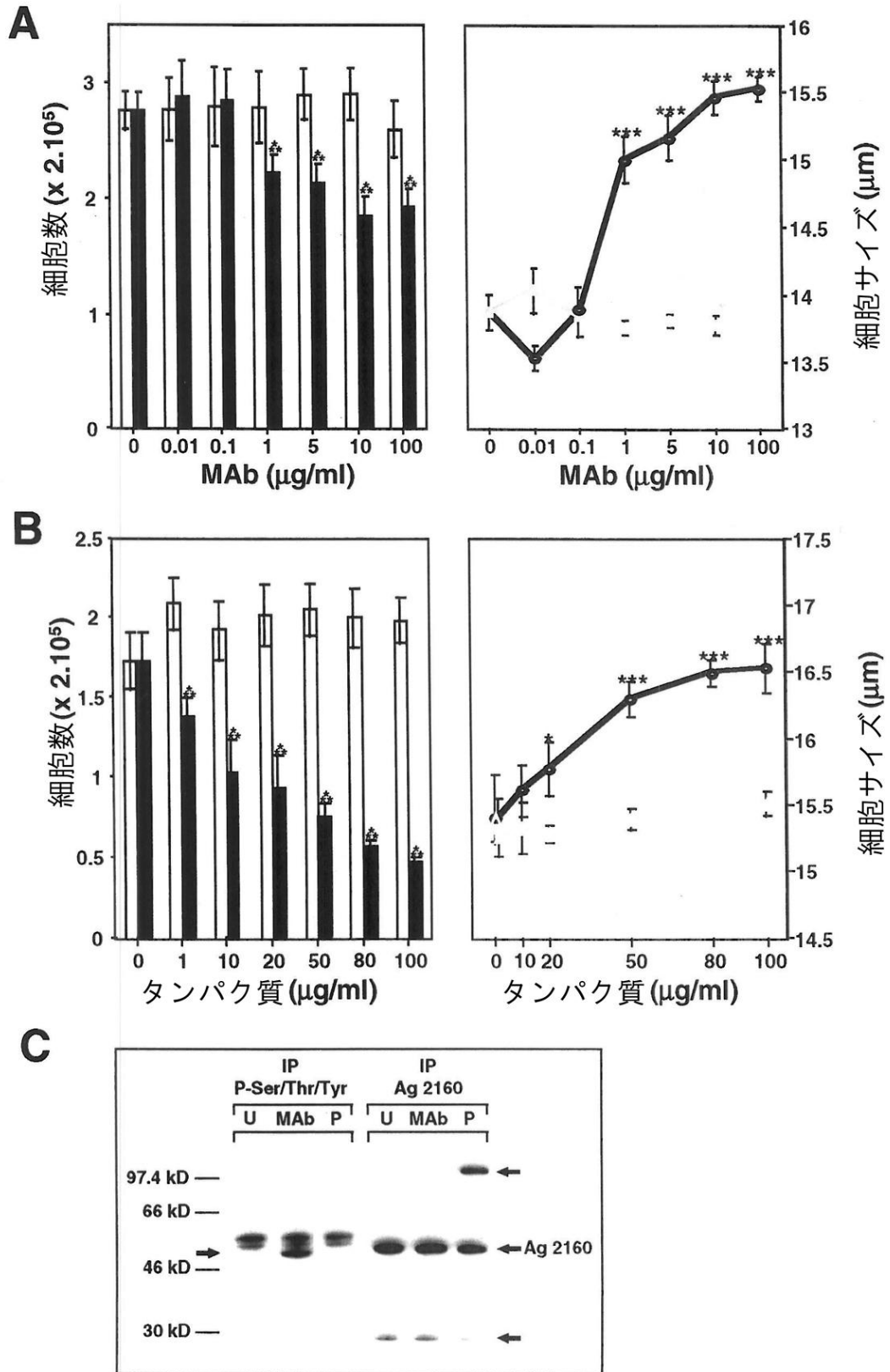
【図5】

図5



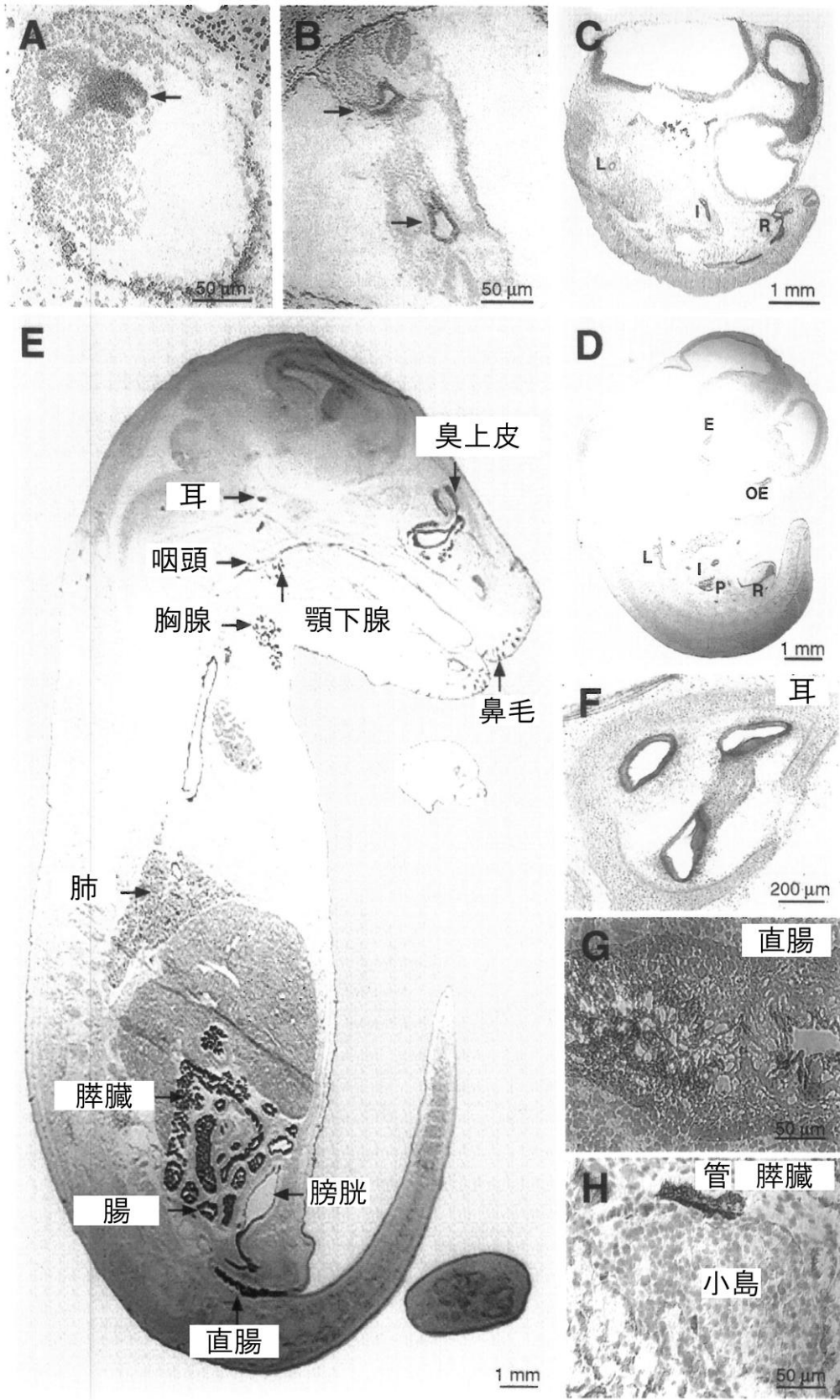
【図7】

図7



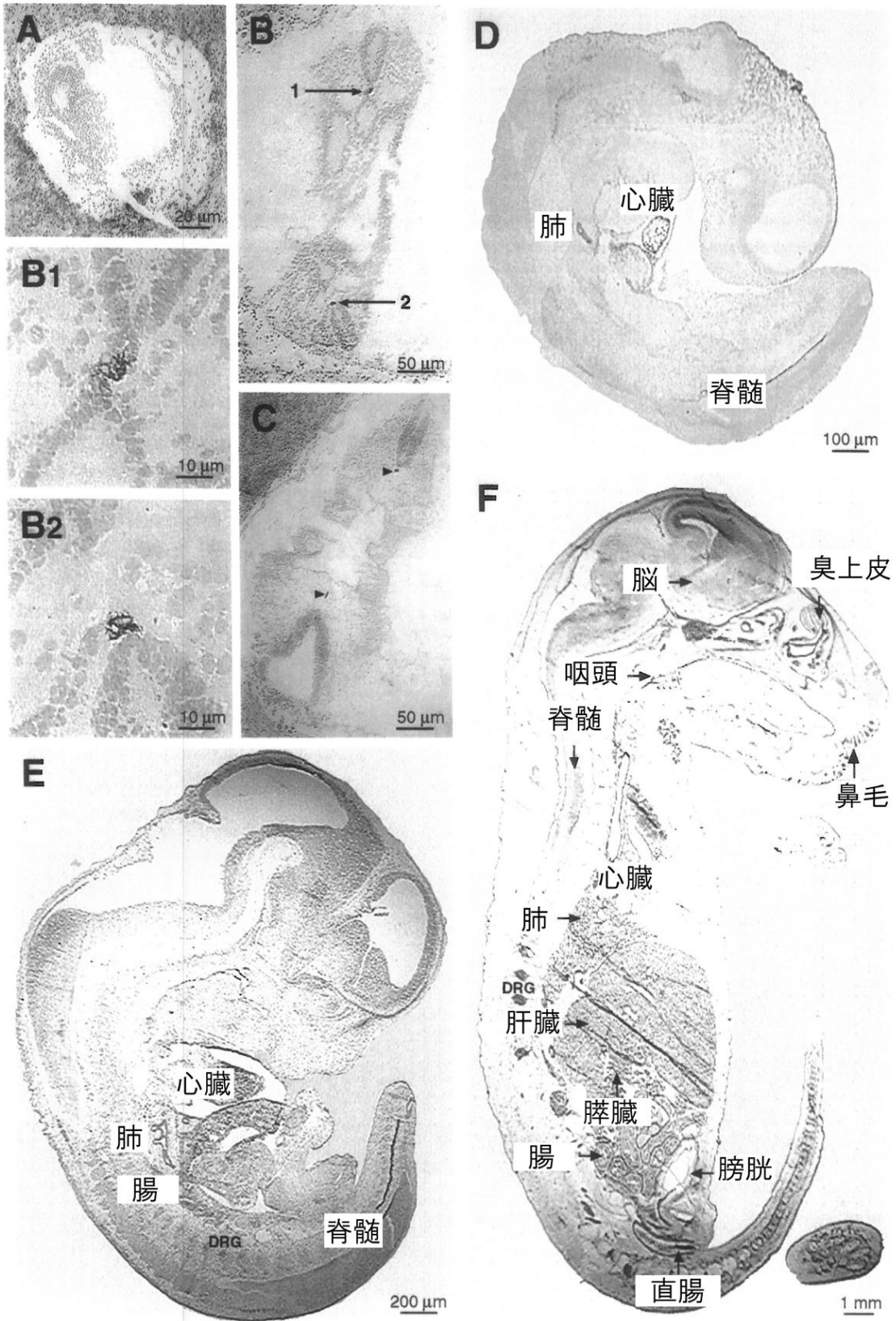
【 図 8 】

図8



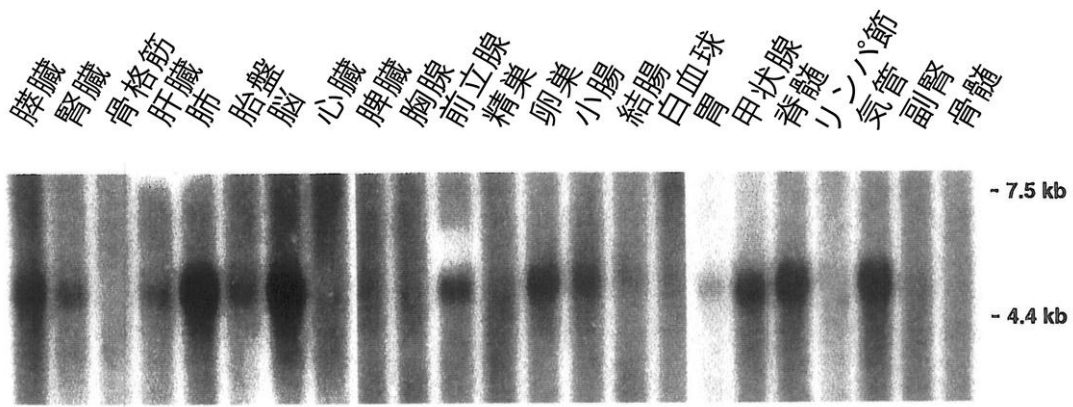
【図9】

図9



【図11】

図11



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 0 7 K 16/28 (2006.01) C 0 7 K 16/28
 C 1 2 N 5/07 (2010.01) C 1 2 N 5/00 E

- (72)発明者 マサー, ジェニー ピー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 3 0, ミルブレ, ラ プレンダ ドライブ 2 6 9
- (72)発明者 バルド, ローラ エヌ.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 6, サニーヴェイル, セナ コート 2 7 8
- (72)発明者 ロバーツ, ペネローペ アール.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 3 0, ミルブレ, ラ プレンダ ドライブ 2 6 9
- (72)発明者 ステファン, ジーン-フィリップ エフ.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 3 0, ミルブレ, タウンスクエア, ランスデール アベ
 ニュー 3 2 0 シー

審査官 石丸 聡

- (56)参考文献 Mol. Biol. Cell, vol. 8, No. Suppl., p. 328a, 1905 (1997)
 FEMS Immunol, Med. Microbiol., vol. 20, pages 79-86 (1998)
 Lab. Anim., vol. 32, pages 387-406 (1998)
 Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 48, pages 123-138 (1995)
 Vet. Immunol. Immunopathol., vol. 40, pages 225-241 (1994)
 Immunology, vol. 90, pages 337-343 (1997)
 Br. J. Cancer, vol. 56., pp. 439-444 (1987)
 Dev. Biol., vol. 212, pp. 264-277 (1999)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C 1 2 P 2 1 / 0 8
 G 0 1 N 3 3 / 5 3
 C A / B I O S I S / M E D L I N E / W P I D S (S T N)
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I)

专利名称(译)	用于产生特定细胞类型的代表性单克隆抗体的组合物和方法		
公开(公告)号	JP4426627B2	公开(公告)日	2010-03-03
申请号	JP2008147491	申请日	2008-06-04
[标]申请(专利权)人(译)	雷奔生物技术股份有限公司雷开球德		
申请(专利权)人(译)	莱本生物技术股份有限公司雷开球德		
当前申请(专利权)人(译)	莱本生物技术股份有限公司雷开球德		
[标]发明人	マサージェニーピー バルドローラエヌ ロバーツベネローペアール ステファンジーンフィリップエフ		
发明人	マサー,ジェニーピー. バルド,ローラ エヌ. ロバーツ,ベネローペ アール. ステファン,ジーン-フィリップ エフ.		
IPC分类号	C12P21/08 C12Q1/04 G01N33/53 G01N33/577 C12N15/02 C07K16/28 C12N5/07 G01N33/48 A61K39/39 A61K39/395 C07K14/705 C07K16/00 C12N5/10 C12N5/20		
CPC分类号	C07K16/28 C07K14/705 C07K2317/73		
FI分类号	C12P21/08.ZNA C12Q1/04 G01N33/53.D G01N33/577.Z C12N15/00.C C07K16/28 C12N5/00.E C07K16/28.ZNA C12N15/00.A C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/00.202.J C12N5/078 C12N5/20 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/577.B		
F-TERM分类号	4B024/AA15 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/DA02 4B063/QA18 4B063/QQ13 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QS05 4B063/QS38 4B063/QX10 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/BA23 4B065/BA30 4B065/BB12 4B065/BB13 4B065/BB32 4B065/BC50 4B065/CA25 4H045/AA20 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72		
代理人(译)	石田 敬		
审查员(译)	石丸聪		
优先权	09/218539 1998-12-22 US		
其他公开文献	JP2009001562A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种产生能够结合特定细胞类型的典型抗原的单克隆抗体群的方法。该方法在使非特异性抗体与特定细胞类型中不存在的蛋白质的交叉反应的产生最小化方面是独特的;该方法还涉及与天然抗原的结合最大限度地保护完整抗原（尤其是表面抗原）的保存，以产生多种单克隆抗体。本发明还包括用于确定特定细胞类型中存在的细胞表面抗原组合的方法。根据本发明，还提供了一群杂交瘤，即由本发明的杂交瘤产生的单克隆抗体。【选择图】无

状態	10%のウシ胎仔血清を補充した培地で培養された rASC細胞での腹腔内免疫化 [アジュバントなし]	無血清培地で培養された rASC細胞での腹腔内免疫化 [アジュバントなし]	10%のウシ胎仔血清を補充した培地で培養された rASC細胞での肢掌免疫化 [アジュバントなし]	無血清培地で培養された rASC細胞での肢掌免疫化 [アジュバントなし]
ハイブリドーマクロンの総数	460	480	64	34
陰性ハイブリドーマクロンの総数	448	442	64	33
陽性ハイブリドーマクロンの総数	12	58	1	1
陽性ハイブリドーマクロンのパーセンテージ	3%	12%	1.5%	3%