

(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2012-505659

(P2012-505659A)

(43) 公表日 平成24年3月8日(2012.3.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 ZNAA	4B024
<b>C07K 16/30 (2006.01)</b>	C07K 16/30	4B064
<b>C07K 19/00 (2006.01)</b>	C07K 19/00	4B065
<b>C07K 14/21 (2006.01)</b>	C07K 14/21	4C085
<b>C07K 7/06 (2006.01)</b>	C07K 7/06	4H045
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 89 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-532263 (P2011-532263)  
 (86) (22) 出願日 平成21年10月15日 (2009.10.15)  
 (85) 翻訳文提出日 平成23年4月12日 (2011.4.12)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/060903  
 (87) 国際公開番号 WO2010/045495  
 (87) 国際公開日 平成22年4月22日 (2010.4.22)  
 (31) 優先権主張番号 61/106,055  
 (32) 優先日 平成20年10月16日 (2008.10.16)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 506339556  
 ユニバーシティ オブ ピッツバーグ -  
 オブ ザ コモンウェルス システム  
 オブ ハイヤー エデュケーション  
 アメリカ合衆国 ペンシルバニア 152  
 60, ピッツバーグ, サッカー ア  
 ンド オハラ ストリーツ, ガードナー  
 スティール カンファレンス センター  
 200

(74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策

(74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明

(74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高分子量メラノーマ関連抗原に対する完全ヒト抗体およびその使用

## (57) 【要約】

HMW - MAA に特異的に結合する単離されたヒトモノクローナル抗体およびその機能性フラグメントが、本明細書中に開示される。これらの抗体をコードする核酸、これらの核酸分子を含む発現ベクター、およびその核酸分子を発現する単離された宿主細胞もまた開示される。それらの抗体は、サンプル中の HMW - MAA を検出するために使用され得る。これらの抗体を利用して癌を診断する方法または癌の診断を確認する方法が本明細書中に開示される。癌を有する被験体を処置する方法も開示される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

単離されたヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメントであって、ここで、該抗体の重鎖は、配列番号 5 のアミノ酸 27 ~ 38、配列番号 5 のアミノ酸 56 ~ 65、配列番号 5 のアミノ酸 105 ~ 115 またはそれらの組み合わせを含み、該抗体は、HMW - MAA に特異的に結合する、単離されたヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメント。

## 【請求項 2】

前記抗体の軽鎖が、配列番号 6 のアミノ酸 27 ~ 38、配列番号 6 のアミノ酸 56 ~ 65、配列番号 6 のアミノ酸 105 ~ 110 またはそれらの組み合わせを含む、請求項 1 に記載の単離されたヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメント。

10

## 【請求項 3】

前記抗体の重鎖が、配列番号 5 のアミノ酸 27 ~ 38、配列番号 5 のアミノ酸 56 ~ 65 および配列番号 5 のアミノ酸 105 ~ 115 を含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の単離されたヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメント。

## 【請求項 4】

前記抗体の重鎖が、配列番号 5 を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の単離されたヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメント。

## 【請求項 5】

前記抗体の軽鎖が、配列番号 6 のアミノ酸 27 ~ 38、配列番号 6 のアミノ酸 56 ~ 65、配列番号 6 のアミノ酸 105 ~ 110 を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の単離されたヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメント。

20

## 【請求項 6】

前記抗体の軽鎖が、配列番号 6 を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の単離されたヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメント。

## 【請求項 7】

前記抗体の重鎖が、配列番号 5 を含み、該抗体の軽鎖が、配列番号 6 を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の単離されたヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメント。

## 【請求項 8】

前記機能性フラグメントが、Fab フラグメント、Fab' フラグメント、F(ab)'<sub>2</sub> フラグメント、一本鎖 Fv タンパク質 (scFv) またはジスルフィド安定化 Fv タンパク質 (dsFv) である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の単離されたヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメント。

30

## 【請求項 9】

前記抗体が、scFv である、請求項 8 に記載のヒトモノクローナル抗体の単離された機能性フラグメント。

## 【請求項 10】

前記抗体が、IgG である、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の単離されたヒトモノクローナル抗体。

40

## 【請求項 11】

前記抗体が、標識されている、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の単離されたヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメント。

## 【請求項 12】

前記標識が、蛍光標識、酵素標識または放射性標識である、請求項 11 に記載の単離されたヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメント。

## 【請求項 13】

請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその機能性フラグメントおよび薬学的に許容可能なキャリアを含む、組成物。

## 【請求項 14】

50

請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメントを含む、単離された免疫結合体。

【請求項 15】

Pseudomonas 外毒素 (PE) またはその改変体もしくはフラグメントを含む、請求項 14 に記載の単離された免疫結合体。

【請求項 16】

請求項 14 または請求項 15 に記載の単離された免疫結合体および薬学的に許容可能なキャリアを含む、組成物。

【請求項 17】

HMW - MAA を発現する癌と診断された被験体を処置する方法であって、治療有効量の請求項 11 または請求項 14 に記載の組成物を該被験体に投与することによって、該被験体において HMW - MAA を発現する癌を処置する工程を包含する、方法。

10

【請求項 18】

前記癌が、メラノーマ、乳癌、頭頸部扁平上皮癌腫、前立腺癌、卵巣癌、結腸癌、神経膠腫、胃癌または膵癌である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

前記被験体の処置が、転移の数またはサイズの減少を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

被験体における癌を検出するかまたは癌の診断を確認する方法であって、該方法は：  
該被験体由来のサンプルを、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の単離されたヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメントと接触させる工程；および  
該サンプルへの、該単離されたヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメントの結合を検出する工程  
を包含し、ここで、コントロールサンプルへの該単離されたヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメントの結合と比較した際の該サンプルへの該単離されたヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメントの結合の増加が、該被験体における癌を検出するか、または該被験体における癌の診断を確認する、方法。

20

【請求項 21】

前記単離されたヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメントが、直接標識されている、請求項 20 に記載の方法。

30

【請求項 22】

前記単離されたヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメントに特異的に結合する 2 次抗体を前記サンプルと接触させる工程、および  
該 2 次抗体の結合を検出する工程  
をさらに包含し、ここで、コントロールサンプルへの該 2 次抗体の結合と比較した際の該サンプルへの該 2 次抗体の結合の増加が、該被験体における癌を検出するかまたは該被験体における癌の診断を確認する、請求項 20 または 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記癌が、メラノーマ、乳癌、頭頸部扁平上皮癌腫、前立腺癌、卵巣癌、結腸癌、神経膠腫、胃癌または膵癌である、請求項 20 ~ 22 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 24】

前記コントロールサンプルが、癌を有しない被験体由来のサンプルである、請求項 20 ~ 23 のいずれかに記載の方法。

【請求項 25】

前記サンプルが、血液、尿、生検材料、血清、痰、血漿、脳髄液サンプルである、請求項 20 ~ 24 のいずれかに記載の方法。

【請求項 26】

前記癌が、転移性である、請求項 20 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメン

50

トをコードする単離された核酸分子。

【請求項 28】

前記ヒトモノクローナル抗体の V<sub>H</sub> ドメインが、配列番号 1 のヌクレオチド配列を含む、請求項 27 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 29】

前記ヒトモノクローナル抗体の V<sub>L</sub> ドメインが、配列番号 3 のヌクレオチド配列を含む、請求項 27 または請求項 28 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 30】

プロモーターに作動可能に連結された、請求項 27 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の単離された核酸分子。

10

【請求項 31】

請求項 27 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の単離された核酸分子を含む、発現ベクター。

【請求項 32】

請求項 27 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の核酸分子または請求項 31 に記載の発現ベクターで形質転換された、単離された宿主細胞。

【請求項 33】

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のヒトモノクローナル抗体に結合する単離されたペプチドであって、ここで、該ペプチドは、コンセンサスモチーフ P X X Y X P X X D (配列番号 9) を含む、単離されたペプチド。

【請求項 34】

請求項 33 に記載の単離されたペプチドであって、該ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 7、配列番号 10、配列番号 13、または配列番号 7、配列番号 10、配列番号 13 の改変体を含み、ここで、該改変体は、3 つ以下のアミノ酸の置換を含む、単離されたペプチド。

20

【請求項 35】

請求項 33 に記載の単離されたペプチドであって、該ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 7、配列番号 10 または配列番号 13 からなる、単離されたペプチド。

【請求項 36】

被験体において H M W - M A A 特異的免疫を誘導する方法であって、請求項 33 ~ 35 のいずれか 1 項に記載のペプチドを該被験体に投与することによって、該被験体において H M W - M A A 特異的免疫を誘導する工程を包含する、方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権主張

これは、2008年10月16日に出願された米国仮出願第 61 / 106 , 055 号 (これは、参考として本明細書に援用される) の利益を主張する。

【0002】

政府の援助についての承認

この発明は、National Institutes of Health の National Cancer Institute によって付与された契約番号第 CA 16056 号および同第 CA 105500 号の下で政府の援助を受けてなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

40

【0003】

分野

本開示は、完全ヒト (fully human) モノクローナル抗体、特に、高分子量メラノーマ関連抗原 (H M W - M A A) に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体、およびそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0004】

50

## 背景

メラノーマは、メラノサイトまたはメラノサイト関連母斑細胞に由来する高悪性度でしばしば転移性の腫瘍である（非特許文献1）。メラノーマは、すべての皮膚癌の約3パーセントを占め、メラノーマの世界的な増加は、女性の肺癌を除く他のいずれの新生物によっても超えられない（非特許文献1；非特許文献2）。メラノーマが、明らかに皮膚に限局されるときでさえ、患者の最大30%が全身転移を発症し、大部分が死亡する（非特許文献2）。メラノーマ処置の従来の様式としては、外科術、放射線照射および化学療法が挙げられる。過去10年間において、メラノーマを処置するための新しい有望な方法として免疫療法および遺伝子治療が登場した。

## 【0005】

癌に対する免疫応答がヒトに存在するという有力な証拠は、メラノーマ沈着物内にリンパ球が存在することによって提供される。これらのリンパ球は、単離されると、自己メラノーマ上および同種メラノーマ上の特異的な腫瘍抗原を主要組織適合遺伝子複合体（MHC）拘束性様式で認識することができる（非特許文献3；非特許文献4；非特許文献5；非特許文献6；非特許文献7；非特許文献8；非特許文献9；非特許文献10）。転移性メラノーマを有する患者由来の腫瘍浸潤リンパ球（TIL）は、メラノサイト-メラノーマ系統特異的組織抗原を含む共有抗原をインビトロにおいて認識する（Kawakamiら（1993）J. Immunother. 14: 88-93；Anichiniら（1993）J. Exp. Med. 177: 989-998）。抗メラノーマT細胞は、おそらく、インビボにおいて腫瘍部位でのクローン性増大および蓄積の結果としてTIL中に多く存在するとみられる（Sensibar（1993）J. Exp. Med. 178: 1231-1246）。多くのメラノーマ患者がこれらの腫瘍に対して細胞性応答および体液性応答を開始するという事実、ならびにメラノーマがMHC抗原と腫瘍関連抗原（TAA）の両方を発現するという事実から、さらなるメラノーマ抗原の同定および特徴づけが、メラノーマを有する患者の免疫療法にとって重要であると示唆される。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0006】

【非特許文献1】Abbas A. K., Lechtman, A. H., Pober, J. S. (編) "Cellular and Molecular Immunology"; W. B. Saunders Company, Philadelphia (1991) 340~341頁

【非特許文献2】Kirkwood and Agarwala, Principles and Practice of Oncology (1993) 7: 1~16

【非特許文献3】Itohar, Cancer Res. (1986) 46: 3011~3017

【非特許文献4】Muulr, J. Immunol. (1987) 138: 989~995

【非特許文献5】Topalianr, J. Immunol. (1989) 142: 3714~3725

【非特許文献6】Darrowr, J. Immunol. (1989) 142: 3329~3335

【非特許文献7】Homr, J. Immunother. (1991) 10: 153~164

【非特許文献8】Kawakami r, J. Immunol. (1992) 148: 638~643

【非特許文献9】Homr, J. Immunother. (1993) 13: 18~30

【非特許文献10】O'Neilr, J. Immunol. (1993) 151: 1410~1418

## 【発明の概要】

10

20

30

40

50

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0007】

CSPG4としても知られるヒトコンドロイチン硫酸プロテオグリカンHMW-MAAは、腫瘍細胞の増殖、遊走および浸潤の刺激に関わる初期の細胞表面メラノマ進行マーカーである。HMW-MAA模倣物で免疫された、メラノマを有する患者におけるHMW-MAAを標的化するワクチンが、HMW-MAA特異的抗体を生じた患者のサブセットだけに有意な延命効果をもたらし、その抗体を生じなかった患者には有意な延命効果をもたらさなかったため、臨床研究は、HMW-MAAを妥当な治療的標的と示唆した。さらに、HMW-MAAを標的化する生物学的意義は、細胞の成長および分化を制御する際の役割に関係し得る。しかしながら、この抗原を標的化する他の免疫療法ストラテジーが未だ必要とされている。

10

## 【課題を解決するための手段】

## 【0008】

## 要約

HMW-MAAに特異的に結合する完全ヒトモノクローナル抗体が、本明細書中で提供される。完全ヒトモノクローナル抗体の機能性フラグメントもまた提供される。いくつかの実施形態において、このヒトモノクローナル抗体は、一本鎖可変フラグメント(scFv)である。HMW-MAA特異的抗体およびその機能性フラグメントを含む組成物、これらの抗体をコードする核酸、その核酸を含む発現ベクター、ならびにその核酸を発現する単離された宿主細胞がさらに提供される。

20

## 【0009】

HMW-MAAに特異的に結合するヒトモノクローナル抗体を含む免疫結合体もまた提供される。その免疫結合体を含む組成物も提供される。

## 【0010】

本明細書中で提供される抗体および組成物は、種々の目的(例えば、被験体における癌の診断を確認すること)のために使用され得る。したがって、被験体における癌の診断を確認する方法が、本明細書中で提供され、その方法は、癌と診断された被験体由来のサンプルを、HMW-MAAに特異的に結合するヒトモノクローナル抗体と接触させる工程、およびそのサンプルへのその抗体の結合を検出する工程を包含する。コントロールサンプルへのその抗体の結合と比べてそのサンプルへのその抗体の結合の増加が、その癌診断を確認する。いくつかの実施形態において、その方法は、HMW-MAA特異的抗体を特異的に認識する2次抗体をサンプルと接触させる工程およびその2次抗体の結合を検出する工程をさらに包含する。

30

## 【0011】

同様に、被験体における癌を検出する方法が本明細書中で提供され、その方法は、その被験体由来のサンプルを本明細書中に記載されるヒトモノクローナル抗体と接触させる工程およびそのサンプルへのその抗体の結合を検出する工程を包含する。コントロールサンプルと比べてそのサンプルへのその抗体の結合の増加が、被験体における癌を検出する。いくつかの実施形態において、その方法は、HMW-MAA特異的抗体を特異的に認識する2次抗体をサンプルと接触させる工程およびその2次抗体の結合を検出する工程をさらに包含する。

40

## 【0012】

癌と診断された被験体を処置する方法がさらに提供され、その方法は、治療有効量のHMW-MAA特異的モノクローナル抗体、その機能性フラグメントまたはその抗体もしくはその機能性フラグメントを含む免疫結合体をその被験体に投与する工程を包含する。いくつかの例において、癌は、メラノマ、頭頸部癌または神経膠腫である。

## 【0013】

HMW-MAAペプチド模倣物もまた提供される。本明細書中に開示されるペプチド模倣物は、HMW-MAAに特異的なヒトモノクローナル抗体に結合する。いくつかの実施形態において、そのペプチド模倣物は、コンセンサス配列PXXYXPXXD(配列番号

50

9)を含む。

【0014】

本発明の前述および他の目的、特徴および利点は、添付の図面を参照しながら進める以下の詳細な説明からより明らかになるだろう。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】ELISAにおけるHMW-MAA<sup>+</sup>ヒト細胞株に対する可溶性scFvC21の選択的反応性。培養ヒトメラノーマ細胞Colo38、FO-1、SK-MEL-28およびMelur（これらのすべてがHMW-MAAを発現する）、ならびにヒト前立腺癌腫細胞PC3、ヒト膀胱癌腫細胞T24、ヒト乳癌腫細胞T47DならびにヒトBリンパ系細胞JY、LG-2およびLKT13（これらのすべてがHMW-MAAを発現しない）、ならびにラット神経芽細胞腫細胞B49（HMW-MAAホモログを発現する）を、50μlの

10

【0016】

【数1】


SNT scFv C21 (  )

)およびビオチン化mAb 9E10 (2.5μg/mlの1%BSA-PBS)とともに4において2時間インキュベートした。scFvフラグメントの結合を、SA-HRPを用いて検出した。結果は、490nmにおける吸光度として表される。

20

【0017】

【数2】

ヒト抗-抗id scFv #119 (  )

)を特異性コントロールとして使用した。

【図2】scFvC21で染色されたHMW-MAA<sup>+</sup>M14#5/HMW-MAAメラノーマ細胞のフローサイトメトリー解析。M14#5/HMW-MAAトランスフェクタントおよび親のHMW-MAA<sup>-</sup>M14#5細胞を、PPscFvC21およびmAb 9E10 (白色ヒストグラム)ならびにコントロールPPscFv119およびmAb 9E10 (灰色ヒストグラム) (上段パネル)、HMW-MAA特異的マウスmAb 763.74 (0.5μg) (白色ヒストグラム)およびコントロールmAb MK2-23 (灰色ヒストグラム) (中段パネル)、ならびにHLAクラスI抗原特異的mAb TP25.99 (白色ヒストグラム)およびコントロールmAb MK2-23 (灰色ヒストグラム) (下段パネル)とともに氷上でインキュベートした。抗体の結合を、ヤギ抗マウスIg抗体のRPE-標識F(ab')<sub>2</sub>フラグメントを用いて検出した。FACSscan<sup>TM</sup>フローサイトメーターを用いて細胞を解析した。結果は、蛍光強度として表される。

30

【図3】HMW-MAA<sup>+</sup>Colo38細胞溶解産物における、scFvC21およびHMW-MAA特異的マウスmAb 763.74によって認識される分子間の構造的関係。

<sup>125</sup>Iで標識されたColo38細胞の1%NP-40抽出物を、mAb 763.74を用いて免疫除去した。その免疫除去された細胞抽出物を不溶化mAb 763.74およびscFvC21とともに免疫沈降した。抗原を溶出し、8%ポリアクリルアミドゲルにおけるSDS-PAGEによって解析した。ゲルを固定し、乾燥し、-80において最大1日間、オートラジオグラフィに供した。100kD MAA特異的マウスmAb 376.94で免疫除去された<sup>125</sup>Iで標識されたColo38細胞の1%NP-40抽出物を、コントロールとして使用した。

40

【図4】HMW-MAA<sup>+</sup>Colo38細胞抽出物から単離されたHMW-MAA上の、scFvC21によって認識される抗原決定基の発現におけるN結合型グリコシル化の役割。ツニカマイシン(0、2および3μg/ml)の存在下における<sup>35</sup>S-メチオニンで標識されたColo38細胞の1%NP-40抽出物を、scFvC21とともに免疫

50

沈降した。抗原を免疫吸着物から溶出し、8%ポリアクリルアミドゲルにおけるSDS-PAGEによって解析した。ゲルを固定し、乾燥し、-80において最大3日間、フルオログラフィのためにHyperfilm-ECLを用いて処理した。HMW-MAA特異的マウスmAb763.74をコントロールとして使用した。

【図5】HMW-MAA<sup>+</sup>メラノーマ細胞SK-MEL-28上における、scFvC21によって定義される決定基とマウスmAb VF1-TP34によって定義される決定基との空間的近接。様々な濃度の

【0018】

【数3】

mAb VF1-TP34 (—●—) (左パネル)

10

をビオチン化scFvC21 (0.25 μg/ウェル)と混合した。次いで、その混合物をHMW-MAA<sup>+</sup>細胞が入ったウェルに移し、4において1時間インキュベートした。抗体の結合を、SA-HRPを用いて検出した。結果は、%阻害として表される。同様に、様々な量の

【0019】

【数4】

PP scFv C21 (—▲—) (右パネル)

を、ビオチン化mAb VF1-TP34 (40 ng/ウェル)と混合した。次いで、その混合物をHMW-MAA<sup>+</sup>細胞が入ったウェルに移し、4において1時間インキュベートした。無関係な

20

【0020】

【数5】

mAb TP25.99 (—○—)

および無関係な

【0021】

【数6】

PP scFv 119 (—△—)

30

を特異性コントロールとして使用した。

【図6】外科的に取り出され凍結されたヒト母斑病変およびヒトメラノーマ病変のscFvC21による免疫組織化学的染色。scFvC21は、凍結された母斑(パネルA)、凍結された原発性メラノーマ病変(パネルB)および凍結された転移性メラノーマ病変(パネルC)を染色する。母斑(パネルD)、原発性メラノーマ病変(パネルE)および転移性メラノーマ病変(パネルF)を無関係なscFv # 119で染色することによって、その染色の特異性をモニターした。

【図7】ELISAにおける、scFvC21を用いたファージディスプレイペプチドライブラリーX15のパニングによって単離されたペプチドに由来する合成ペプチドに対するscFvC21の反応性。96ウェルプレートを、0.25%グルタルアルデヒド(glutaraldehyde)-PBS中の

40

【0022】

【数7】

合成ペプチド PIC21 (■), P2C21 (125 μM) (▣), および P3C21 (125 μM) (■)

で37において2時間コーティングした。PBS-1%BSAでブロッキングした後、ウェルを50 μlのPP scFvC21および50 μlのビオチン化mAb 9E10 (2.5 μg/mlの1%BSA-PBS)とともに室温において2時間インキュベートした。ペプチドへのscFv抗体の結合を、SA-HRPを加えることによって検出した。

50

結果は、490  $\mu$ Mにおける吸光度として表される。無関係なHMW - MAA決定基および無関係なペプチドMART-1 (AAGIGILT V)を認識するヒトscFv # 28  
 【0023】  
 【数8】  
 (■■■)

を特異性コントロールとして使用した。

【図8】合成ペプチドP1C21およびP3C21ならびに改変ペプチドP3C21による、HMW - MAA<sup>+</sup>細胞Colo38に対するscFvC21の反応性の阻害。様々な濃度の  
 【0024】  
 【数9】

10

合成ペプチドP1C21(—●—), P3C21(—▲—),

P3A5(—◇—), P3V7(—+—)およびP3S10(—■—)

を、50  $\mu$ lのPPscFv (1%BSA - PBSにおける1:1600希釈物)および50  $\mu$ lのビオチン化mAb 9E10 (2.5  $\mu$ g/mlの1%BSA - PBS)とともに4において2時間インキュベートした。次いで、その混合物をColo38細胞が入ったウェルに移した。scFvC21の結合を、SA - HRPを用いて検出した(上パネル)。結果は、%阻害として表される。無関係な

20

【0025】

【数10 - 1】

ペプチドMART-1(—▽—)

および無関係なHMW - MAA決定基を認識するscFv # 28 (下パネル)を特異性コントロールとして使用した。

【図9】ペプチドP1C21で免疫され、Colo38細胞でブーストされたBALB/cマウスにおける、HMW - MAA<sup>+</sup>細胞Colo38に対して選択的な反応性を有する抗体の作製。0、21、42、63、84および105日目に

30

【0026】

【数10 - 2】

KLH-結合体化ペプチドP1C21(■)

(50  $\mu$ g/注射)で、そして132日目にHMW - MAA<sup>+</sup>Colo38メラノーマ細胞(5  $\times$  10<sup>5</sup>細胞/注射)で、マウスを免疫した。最初の免疫の1週間前および各免疫の1週間後に血清を回収した。血清の2倍希釈物(100  $\mu$ l/ウェル)をHMW - MAA<sup>+</sup>Colo38メラノーマ細胞(1  $\times$  10<sup>5</sup>/ウェル)とともにインキュベートした。HRP結合体化ヤギ抗マウスIgG抗体とさらにインキュベートした後、その反応物を、TMB基質を用いて発色させた。450nmにおけるO.D.を測定した。結果は、HMW - MAA<sup>+</sup>細胞への最大結合の50%をもたらす最も高い希釈の血清の平均 $\pm$ SDとして表される。ペプチドMB1<sub>194-208</sub>で免疫されたマウス由来の血清をコントロールとして使用した。\* p < 0.05。

40

【図10】BALB/cマウスにおいてペプチドP1C21およびHMW - MAA<sup>+</sup>細胞Colo38によって誘発された抗体で染色されたHMW - MAA<sup>+</sup>M14 # 5/HMW - MAAメラノーマ細胞のフローサイトメトリー解析。M14 # 5/HMW - MAAトランスフェクトおよび親のHMW - MAA<sup>-</sup>M14 # 5細胞を、ペプチドP1C21で免疫されたマウス由来の100  $\mu$ lの血清(1:60希釈物)(上段パネル)、およびペプチドP1C21またはコントロールペプチドMB1<sub>194-208</sub>で免疫され、HMW - MAA<sup>+</sup>細胞Colo38でブーストされたマウス由来の血清(中段パネル)とともに氷上でインキュベートした。洗浄後、細胞を、ヤギ抗マウスIgG抗体のRPE標識F(a

50

b')<sub>2</sub> フラグメントとともに氷上でインキュベートした。次いで細胞を、FACSscan<sup>TM</sup> フローサイトメトリーを用いて解析した。結果は、蛍光強度として表される(白色ヒストグラム)。コントロールとして、免疫前の血清(灰色ヒストグラム)、コントロールペプチドMB1<sub>194-208</sub>で免疫されたマウス由来の血清(上段パネル)、ペプチドMB1<sub>194-208</sub>で免疫され、HMW-MAA<sup>+</sup>メラノーマ細胞Colo38でブーストされたマウス由来の血清(中段パネル)、およびペプチドP1C21またはペプチドMB1<sub>194-208</sub>で免疫され、HMW-MAA<sup>-</sup>リンパ系細胞LG2でブーストされたマウス由来の血清(下段パネル)を使用した。

【図11】ペプチドP1C21で免疫され、HMW-MAA<sup>+</sup>細胞Colo38でブーストされたマウス由来の血清のHMW-MAA特異性の免疫化学的な特徴づけ。<sup>125</sup>Iで標識されたColo38メラノーマ細胞の1% Triton X-100抽出物を、ペプチドP1C21およびHMW-MAA<sup>+</sup>細胞Colo38で連続的に免疫されたマウス由来の血清とともに免疫沈降した(レーンB)。抗原を免疫吸着物から溶出し、8%ポリアクリルアミドゲルにおけるSDS-PAGEによって解析した。ゲルを固定し、乾燥し、-80において2日間、オートラジオグラフィに供した。コントロールとして、HMW-MAA特異的マウスmAb763.74(レーンA)、ペプチドP1C21で免疫され、HMW-MAA<sup>-</sup>リンパ系細胞LG2でブーストされたマウス由来の血清(レーンC)およびコントロールペプチドMB1<sub>194-208</sub>で免疫され、HMW-MAA<sup>+</sup>Colo38メラノーマ細胞でブーストされたマウス由来の血清のレーン(レーンD)を使用した。

【図12】ペプチドP1C21で免疫されたBALB/cマウスにおけるHMW-MAA<sup>+</sup>メラノーマ細胞Colo38に対するDTH反応。照射された(20Krad) HMW-MAA<sup>+</sup>細胞Colo38(5×10<sup>5</sup>細胞/マウス)

【0027】

【数11】

(目)

およびHMW-MAA<sup>-</sup>LG2細胞(5×10<sup>5</sup>細胞/マウス)( )を、それぞれBALB/cマウスの右および左足蹠に132日目に注射した(それらのマウスは、0、21、42、63、84および105日目にペプチドP1C21で6回免疫されていた)。注射された細胞によって誘導された腫脹の量は、細胞を注射した24時間後に測定された足蹠の厚さから、0時間において測定された足蹠の厚さを減算することによって、測定され、算出された。同じスケジュールを用いてコントロールペプチドMB1<sub>194-208</sub>で免疫されたマウスに同じ時点においてColo38またはLG2細胞を注射し、そのマウスをコントロールとして使用した。\* p < 0.05。

【図13】scFvC21-P1C21および-P3C21ペプチド複合体の分子モデル。scFvC21のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>が示されている。非正規構造をとるHCDR3およびLCDR3もまた示されている。環状P1C21ペプチドの結合が、左パネルに示されている。その結合エネルギーは、-93.8Kcal/molである。残基7Pro、5Tyrおよび4Trpが、特異性を定義する。scFvC21への線状P3C21の結合が、右パネルに示されている。その結合エネルギーは、-7.3Kcal/molである。P3C21ペプチドは、その結合様式においてより伸びた構造をとる。重要な結合部分は、H1とH3との間で4Arg、7Proおよび5Tyrにおよんで観察された。保存された残基のうちの一つ(10Asp)が、溶媒に露出されるが、疎水性ポケットに埋もれた近位のロイシンが、安定した複合体を促す。

【図14】scFv-FcC21によるヒトメラノーマ細胞株の表面染色を示しているフロー解析。

【図15】scFv-FcC21によるヒト神経膠腫細胞株LN444およびA1207の表面染色ならびにscFv-FcC21によるヒト頭頸部癌細胞株PCI30およびPCI13の表面染色を示しているフロー解析。

10

20

30

40

50

【図16】 s c F v - F c C 2 1によるヒトメラノーマ細胞 M V 3の実験的肺転移の阻害を示しているデジタル画像およびグラフ。プロトコルは、以下のとおりだった：0日目：M V 3細胞を  $1.4 \times 10^6$  / マウスで i . v . 注射；3日目：m A b 治療を開始：1週間に2回、 $100 \mu\text{g}$  / マウス ( m o u s ) , i . v . ; 27日目：マウスを屠殺し、後の解析のために肺を回収し、ホルマリン固定し、パラフィン包埋し、H & E 染色：各切片のランダムに選択された5つの高倍率視野 (  $\times 200$  ) の写真を撮影し、次いで、S P O T ソフトウェアを用いて腫瘍面積を測定。示されている値は、各群の平均腫瘍面積である。\* \* は、 $p < 0.01$ を示す。

【図17】 s c F v - F c C 2 1がマウス内の転移性病変における腫瘍細胞の増殖を阻害することを示しているデジタル画像およびグラフ。プロトコルは、以下のとおりだった：0日目：M V 3細胞を  $1.4 \times 10^6$  / マウスで i . v . 注射；3日目：抗体療法を開始：1週間に2回、 $100 \mu\text{g}$  / マウス, i . v . ; 27日目：マウスを屠殺し、肺を回収し、ホルマリン固定し、パラフィン包埋。

【図18】 s c F v - F c C 2 1による原発腫瘍の成長および局所的腫瘍再発の阻害。プロトコルは、以下のとおりだった：0日目： $1.5 \times 10^6$  / マウスでの腫瘍細胞 M V 3を S . C . 接種；7日目：1週間に2回、s c F v - F c (  $100 \mu\text{g}$  ) を i . v . 投与；28日目：腫瘍の外科的除去；35日目：1週間に2回、s c F v - F c (  $100 \mu\text{g}$  ) を i . v . 投与；61日目：再発した腫瘍のサイズが I A C U C によって設定された限界に達したのでマウスを屠殺。

【図19】マウスにおける s c F v - F c C 2 1による局所的腫瘍再発の阻害を示しているデジタル画像。

【図20】マウスにおける s c F v - F c C 2 1による外科術後の自然肺転移の阻害。

【図21】外科的に取り出された原発性 M V 3 腫瘍組織における、低レベルの P K C - および p - S r c を示しているデジタル画像およびグラフ。

【図22】 s c F v - F c C 2 1による M D A - M B - 2 3 1 のインビトロ細胞遊走の阻害を示しているデジタル画像およびグラフ。遊走アッセイでは、M D A - M B - 2 3 1 細胞を播種し、s c F v - F c C 2 1、コントロール s c F v - F c 1 1 9 または P B S とともにインキュベートした。Z e i s s I n v e r t e d F l u o r e s c e n c e M i c r o s c o p e ( A x i o V i s i o n S o f t w a r e ) 下において、各ウェルの写真を撮影した (  $\times 200$  ) 。結果は、抗体を含まない P B S において得られた値を参照として利用して、遊走の%阻害として表される。示される値は、3回の独立した実験の平均値である。\* \* \* は、 $p < 0.001$ を示す。

【図23】 s c F v - F c . C 2 1による M D A - M B - 2 3 1 のインビトロ細胞成長の阻害のグラフ。M D A - M B - 2 3 1 細胞を、3 D ( マトリゲル ) 設定において6日間、s c F v - F c C 2 1 またはコントロール s c F v - F c 1 1 9 で処置した。両方の抗体に対する溶媒として使用した P B S を 1 0 0 % 細胞成長についての参照として使用した。次いで、各ウェル内の細胞を、C e l l R e c o v e r y S o l u t i o n ( B D P h a r m i n g e n ) を用いてマトリゲルから回収し、トリパンブルーを用いて2人が計数した。結果は、P B S のみにおいて得られた値を参照として利用して、細胞成長の%阻害として表される。示される値は、2回の独立した実験の平均値である。\* \* \* は、 $p < 0.001$ を示す。

【図24】ウエスタンプロットのデジタル画像。p - A k t , p - E r k 1 / 2 および E r k 1 / 2 のレベルは、s c F v - F c C 2 1 による処理後に著しく低下している。

【図25】ウエスタンプロットのデジタル画像。 - カテニンは、s c F v 0 F c C 2 1 による処理後に減少している。 - カテニンは、悪性形質転換中に乱れる細胞間接着、細胞シグナル伝達および遺伝子転写に参与する。原発性メラノーマ細胞に対する N o t c h 1 の腫瘍形成作用は、N o t c h 1 活性化の後にアップレギュレートされる - カテニンによって媒介される。 - カテニンの発現を阻害することにより、N o t c h 1 によって増強される腫瘍の成長および転移が逆転した ( K l a r a B . ら、J . C l i n . I n v e s t . 1 1 5 ( 1 1 ) : 3 1 6 6 - 3 1 7 6 , 2 0 0 5 もまた参照のこと)。

10

20

30

40

50

【図26】ウエスタンブロットのデジタル画像。p-PTEN (ser380/Thr382/383)、非ホスホPTEN (ser380/Thr382/383) およびPTENのレベルは、scFv-FcC21による処理後に上昇している。ホスホイノシチド依存性タンパク質キナーゼ (PKC) のレベルは、scFv-FcC21による処理後に低下している。PKC、p-FAKおよびFAKのレベルは、低下している。

【発明を実施するための形態】

【0028】

配列表

添付の配列表に列挙されている核酸配列およびアミノ酸配列を、37C.F.R.1.822に規定されているように、ヌクレオチド塩基については標準的な文字省略形、およびアミノ酸については3文字コードを用いて示す。各核酸配列の一方の鎖だけを示すが、相補鎖は、表示される鎖の参照により含まれると理解される。添付の配列表において：

配列番号1は、scFvC21のV<sub>H</sub>ドメインのヌクレオチド配列である。

【0029】

配列番号2は、scFvC21リンカーのヌクレオチド配列である。

【0030】

配列番号3は、scFvC21のV<sub>L</sub>ドメインのヌクレオチド配列である。

【0031】

配列番号4は、ヒンジ、CH2およびCH3ドメインを含む免疫グロブリン重鎖のヌクレオチド配列である。

【0032】

配列番号5は、scFvC21のV<sub>H</sub>ドメインのアミノ酸配列である。

【0033】

配列番号6は、scFvC21のV<sub>L</sub>ドメインのアミノ酸配列である。

【0034】

配列番号7は、ペプチドP1C21のアミノ酸配列である。

【0035】

配列番号8は、ペプチドP2C21のアミノ酸配列である。

【0036】

配列番号9は、scFvC21に結合するペプチドのアミノ酸コンセンサス配列である。

【0037】

配列番号10は、ペプチドP3C21のアミノ酸配列である。

【0038】

配列番号11は、ペプチドP3A5のアミノ酸配列である。

【0039】

配列番号12は、ペプチドP3V7のアミノ酸配列である。

【0040】

配列番号13は、ペプチドP3S10のアミノ酸配列である。

【0041】

配列番号14は、HMW-MAAのアミノ酸配列である。

【0042】

配列番号15は、HMW-MAAをコードする例示的な核酸配列である。

【0043】

詳細な説明

ヒトコンドロイチン硫酸プロテオグリカンHMW-MAAは、メラノーマを有する多くの割合の患者における病変内および病変間においてあまり不均一でなくメラノーマ細胞上で高発現し、正常組織における分布が限定的であるので (Ferroneら、Radio Labeled Monoclonal Antibodies for Imaging and Therapy 152:55, 1988)、メラノーマの免疫療法を行う

10

20

30

40

50

ための魅力的な標的である (Spitlerら、Cancer Res 47:1717-1723, 1987; Mittelmanら、J Clin Invest 86:2136-2144, 1990; Quanら、J Clin Oncol 15:2103-2110, 1997)。同定されているヒト腫瘍抗原の大部分と同様に、HMW-MAAは、自己抗原である。結果として、HMW-MAAは、メラノーマを有する患者において免疫原性が低い (Hambyら、Cancer Res 47:5284-5289, 1997)。メラノーマを有する患者では免疫原としてのHMW-MAAの適用が妨げられるというこの限界を克服するために、マウスmAbによって定義されるHMW-MAA決定基を模倣するマウス抗イディオタイプ (anti-id) モノクローナル抗体 (mAb) が、臨床試験において積極的な特異的免疫療法を行うために使用されている (Mittelmanら、J Clin Invest 86:2136-2144, 1990; Quanら、J Clin Oncol 15:2103-2110, 1997; Mittelmanら、Proc Natl Acad Sci USA 89:466-470, 1992; Prideら、Clin Cancer Res 4:2363-2370, 1998)。HMW-MAA模倣物は、免疫された患者の約60%においてHMW-MAA特異的な体液性免疫を誘導すると見出されている (Mittelmanら、Proc Natl Acad Sci USA 89:466-470, 1992)。この免疫と、少数の患者における転移の後退 (Mittelmanら、Cancer Res 54:415-421, 1994) および統計学的に有意な生存時間の延長 (Mittelmanら、Proc Natl Acad Sci USA 89:466-470, 1992) との関連は、HMW-MAA模倣物を用いた免疫ストラテジーの最適化への関心を刺激した。

#### 【0044】

これまで、HMW-MAAの抗原性プロファイルの特徴づけおよび模倣物の開発は、マウスmAbによって認識される決定基に限定されてきた。マウスmAbの多くのパネルを使用することにより、6つの異なる空間的に遠位の抗原決定基が、HMW-MAA上で同定された (Campoliら、Crit Rev Immunol 24:267-296, 2004)。さらに、マウスmAbによって定義される抗原決定基の模倣物が、開発され、それらの免疫原性について特徴づけられた (Luoら、J Immunol 174:7104-7110, 2005)。対照的に、限られた数のHMW-MAA特異的ヒトscFv抗体だけが、ファージディスプレイscFv抗体ライブラリーから単離されており、マウスmAbによって認識される抗原決定基とは異なる抗原決定基を認識すると示された (Desaiら、Cancer Res 58:2417-2425, 1998; Noronhaら、J Immunol 161:2968-2976, 1998)。さらに、HMW-MAA特異的ヒト抗体によって同定される抗原決定基の模倣物は、未だ単離されていないし、免疫原性の特性について解析されていない。利用可能なHMW-MAA特異的ヒトscFv抗体の低い結合定数を反映し得るものである情報の欠如 (Desaiら、Cancer Res 58:2417-2425, 1998; Noronhaら、J Immunol 161:2968-2976, 1998) は、HMW-MAA模倣物を用いた免疫ストラテジーの最適化に対して負の影響を有する。

#### 【0045】

したがって、ヒト免疫レパートリーをより反映している、半合成ファージディスプレイscFv抗体ライブラリーから単離されたHMW-MAA特異的scFv (C21)、および以前に報告されたものよりも高い親和性を有するscFv抗体の起源が、本明細書中に開示される。HMW-MAAに特異的に結合するこのヒトモノクローナル抗体由来の1つ以上のCDRを含む抗体もまた開示される。さらに、scFvC21の詳細な特異性が定義され、それを利用して、ファージディスプレイペプチドライブラリーからHMW-MAAペプチド模倣物が単離される。これらのペプチドは、HMW-MAAに特異的なヒトモノクローナル抗体に結合する。いくつかの実施形態において、そのペプチド模倣物は、コンセンサス配列PXXYXPXXD (配列番号9)を含む。

## 【0046】

## I. 省略形

CDR	相補性決定領域	
CT	コンピュータ断層撮影法	
DMSO	ジメチルスルホキシド	
DTH	遅延型過敏	
EDC	N - エチル - N' - (ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド	
ELISA	酵素結合免疫吸着測定法	
FBS	ウシ胎児血清	
HMW - MAA	高分子量メラノーマ関連抗原	10
HNSCC	頭頸部扁平上皮癌腫	
HPLC	高圧液体クロマトグラフィ	
IPTG	イソプロピル - $\beta$ - D - チオガラクトピラノシド	
KLH	キーホールリンペットヘモシアニン	
mAb	モノクローナル抗体	
MBS	マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミド	
MRI	磁気共鳴画像法	
NHS	N - ヒドロキシスクシンイミド	
OD	光学濃度	
PAGE	ポリアクリルアミドゲル電気泳動	20
PBS	リン酸緩衝食塩水	
PET	ポジトロン放出断層撮影法	
PP	細胞周辺調製物	
s.c.	皮下	
scFv	一本鎖可変フラグメント	
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム	
SNT	上清	
SPR	表面プラズモン共鳴	

## II. 用語

別段述べられない限り、専門用語は、通常の使用法に従って用いられる。分子生物学における通常用語の定義は、1994年にOxford University Pressによって出版されたBenjamin Lewin, Genes V (ISBN0-19-854287-9); 1994年にBlackwell Science Ltd.によって出版されたKendrewら(eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology (ISBN0-632-02182-9); および1995年にVCH Publishers, Inc.によって出版されたRobert A. Meyers(ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference (ISBN1-56081-569-8)に見られ得る。

## 【0047】

本開示の様々な実施形態の概説を容易にするために、以下の特定の用語の説明を提供する：

動物：生存している多細胞脊椎動物、例えば、哺乳動物および鳥類をはじめとしたカテゴリー。哺乳動物という用語には、ヒトと非ヒト哺乳動物の両方が含まれる。同様に、用語「被験体」は、ヒトと動物被験体の両方を包含する。

## 【0048】

抗体：HMW - MAAなどの抗原のエピトープまたはそのフラグメントを特異的に認識し、特異的に結合する、少なくとも軽鎖または重鎖免疫グロブリン可変領域を含むポリペプチドリガンド。抗体は、重鎖および軽鎖から構成され、それらの各々は、可変重鎖( $V_H$ )領域および可変軽鎖( $V_L$ )領域と呼ばれる可変領域を有する。 $V_H$ 領域および $V_L$

領域は一体となって、その抗体によって認識される抗原への結合に關与する。

【0049】

抗体には、インタクトな免疫グロブリンならびに当該分野で周知の抗体の改変体および部分（例えば、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab)'<sub>2</sub>フラグメント、一本鎖Fvタンパク質（「scFv」）およびジスルフィド安定化Fvタンパク質（「dsFv」）が含まれる。scFvタンパク質は、免疫グロブリンの軽鎖可変領域と免疫グロブリンの重鎖可変領域とがリンカーによって結合されている融合タンパク質であり、dsFvでは、それらの鎖は、それらの鎖の会合を安定化させるジスルフィド結合を導入するように変異導入されている。この用語は、キメラ抗体（例えば、ヒト化マウス抗体）、ヘテロ結合体抗体（例えば、二重特異性抗体）などの遺伝的に操作された形態も包含する。Pierce Catalog and Handbook, 1994 - 1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kubly, J., Immunology, 3<sup>rd</sup> Ed., W.H. Freeman & Co., New York, 1997もまた参照のこと。

10

【0050】

代表的には、天然に存在する免疫グロブリンは、ジスルフィド結合によって相互接続されている重（H）鎖および軽（L）鎖を有する。ラムダ（ $\lambda$ ）およびカッパー（ $\kappa$ ）という2タイプの軽鎖が存在する。抗体分子の機能活性を決定する5つの主要な重鎖のクラス（またはアイソタイプ）：IgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEが存在する。

【0051】

重鎖および軽鎖の各々は、定常領域および可変領域を含む（これらの領域は、「ドメイン」としても知られる）。重鎖および軽鎖の可変領域は、共同して抗原に特異的に結合する。軽鎖および重鎖の可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」とも呼ばれる3つの超可変領域によって中断される「フレームワーク」領域を含む。フレームワーク領域およびCDRの範囲は、定義されている（Kabataら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991（これは本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。Kabataデータベースは、現在、オンラインで維持されている。異なる軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は、ヒトなどの種内で比較的保存されている。構成要素である軽鎖および重鎖の組み合わせられたフレームワーク領域である抗体のフレームワーク領域は、CDRを3次元空間に位置するためおよび整列させるために役立つ。

20

30

【0052】

CDRは、主に抗原のエピトープへの結合に關与する。各鎖のCDRは、代表的には、N末端から出発して順番に番号が付けられCDR1、CDR2およびCDR3と呼ばれ、代表的には、特定のCDRが位置する鎖によっても特定される。したがって、V<sub>H</sub>CDR3は、それが見られる抗体の重鎖の可変ドメインに位置する一方、V<sub>L</sub>CDR1は、それが見られる抗体の軽鎖の可変ドメイン由来のCDR1である。HMW-MAAに結合する抗体は、特異的なV<sub>H</sub>領域配列およびV<sub>L</sub>領域配列を有し、ゆえに、特異的なCDR配列を有する。異なる特異性（すなわち、異なる抗原に対する異なる結合部位）を有する抗体は、異なるCDRを有する。CDRは、抗体ごとに異なるが、それらのCDR内の限られた数のアミノ酸位置だけが、抗原結合に直接関わる。そのCDR内のこれらの位置は、特異性決定残基（SDRs）と呼ばれる。

40

【0053】

「V<sub>H</sub>」または「VH」という言及は、Fv、scFv、dsFvまたはFabの可変領域を含む、免疫グロブリン重鎖の可変領域のことを指す。「V<sub>L</sub>」または「VL」という言及は、Fv、scFv、dsFvまたはFabの可変領域を含む、免疫グロブリン軽鎖の可変領域のことを指す。

【0054】

「モノクローナル抗体」は、Bリンパ球の単クローンまたは単一の抗体の軽鎖遺伝子

50

および重鎖遺伝子がトランスフェクトされた細胞によって産生される抗体である。モノクローナル抗体は、例えば、ミエローマ細胞と免疫脾臓細胞との融合によるハイブリッド抗体形成細胞を作製することなどの、当業者に公知の方法によって作製される。モノクローナル抗体には、ヒト化モノクローナル抗体が含まれる。

【0055】

「キメラ抗体」は、ヒトなどの1つの種由来のフレームワーク残基およびH M W - M A Aに特異的に結合するマウス抗体などの別の種由来のC D R（一般に、抗原結合性を付与する）を有する。

【0056】

「ヒト」抗体（「完全ヒト」抗体とも呼ばれる）は、ヒトフレームワーク領域およびヒト免疫グロブリン由来のすべてのC D Rを含む抗体である。1つの例において、フレームワークおよびC D Rは、同じ起源のヒト重鎖および/または軽鎖アミノ酸配列に由来する。しかしながら、1つのヒト抗体に由来するフレームワークは、異なるヒト抗体に由来するC D Rを含むように操作され得る。「ヒト化」免疫グロブリンは、ヒトフレームワーク領域および非ヒト（例えば、マウス、ラットまたは合成）免疫グロブリン由来の1つ以上のC D Rを含む免疫グロブリンである。C D Rを提供する非ヒト免疫グロブリンは、「ドナー」と呼ばれ、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンは、「アクセプター」と呼ばれる。1つの実施形態において、すべてのC D Rが、ヒト化免疫グロブリンにおけるドナー免疫グロブリンに由来する。定常領域は、存在しなくてもよいが、存在する場合、それらは、ヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一、すなわち、少なくとも約85～90%、例えば、約95%またはそれ以上同一でなければならない。それゆえ、おそらくC D Rを除くヒト化免疫グロブリンのすべての部分が、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。「ヒト化抗体」は、ヒト化軽鎖およびヒト化重鎖免疫グロブリンを含む抗体である。ヒト化抗体は、C D Rを提供するドナー抗体と同じ抗原に結合する。ヒト化免疫グロブリンまたはヒト化抗体のアクセプターフレームワークは、ドナーフレームワークに由来するアミノ酸による限られた数の置換を有し得る。ヒト化モノクローナル抗体または他のモノクローナル抗体は、抗原結合性または他の免疫グロブリン機能に対して実質的に影響を及ぼさないさらなる保存的アミノ酸置換を有し得る。ヒト化免疫グロブリンは、遺伝子操作を用いて構築され得る（例えば、米国特許第5,585,089号を参照のこと）。

【0057】

結合親和性：抗原に対する抗体の親和性。1つの実施形態において、親和性は、F r a n k e l ら、M o l . I m m u n o l . , 16 : 101 - 106 , 1979によって報告されたS c a t c h a r d法の変法によって計算される。別の実施形態において、結合親和性は、抗原/抗体解離速度によって測定される。別の実施形態において、高い結合親和性は、競合ラジオイムノアッセイによって測定される。別の実施形態において、結合親和性は、E L I S Aによって測定される。高親和性でH M W - M A Aなどの抗原に「特異的に結合」する抗体は、他の無関係の抗原に著しく結合しない。

【0058】

乳癌：良性または悪性であり得る乳房組織の新生物状態。最も一般的なタイプの乳癌は、乳管癌腫である。非浸潤性乳管癌腫は、乳管の非侵襲性新生物状態である。小葉癌腫は、侵襲性疾患ではなく、癌腫が発生し得る指標である。浸潤性（悪性）の乳癌腫は、ステージ（I、IIA、IIB、IIIA、IIIBおよびIV）に分けられ得る。

【0059】

化学療法剤：異常な細胞成長を特徴とする疾患の処置において治療的に有用な任意の化学剤。そのような疾患としては、腫瘍、新生物および癌、ならびに乾癬などの肥厚成長を特徴とする疾患が挙げられる。1つの実施形態において、化学療法剤は、リンパ腫、白血病または別の腫瘍を処置する際に有用な薬剤である。1つの実施形態において、化学療法剤は、放射性化合物である。当業者は、有用な化学療法剤を容易に特定し得る（例えば、H a r r i s o n ' s P r i n c i p l e s o f I n t e r n a l M e d i c i

10

20

30

40

50

ne, 14th edition中のChapter 86のSlapak and Kufe, Principles of Cancer Therapy; Abeloff, Clinical Oncology 2<sup>nd</sup> ed., (著作権) 2000 Churchill Livingstone, Inc中のCh. 17のPerryら、Chemotherapy; Baltzer, L., Berkery, R. (eds.): Oncology Pocket Guide to Chemotherapy, 2nd ed. St. Louis, Mosby - Year Book, 1995; Fischer, D.S., Knobf, M.F., Durivage, H.J. (eds): The Cancer Chemotherapy Handbook, 4th ed. St. Louis, Mosby - Year Book, 1993を参照のこと)。併用化学療法は、癌を処置する2つ以上の薬剤の投与である。1つの例は、放射性化合物または化学的化合物と組み合わせて使用される、HMW - MAAに結合する抗体またはそのフラグメントの投与である。

10

## 【0060】

キメラ抗体：代表的には異なる種の2つの異なる抗体に由来する配列を含む抗体。最も代表的には、キメラ抗体は、ヒトおよびマウスの抗体ドメイン、一般に、ヒト定常領域ならびにマウスの可変領域、マウスCDRおよび/またはマウスSDRを含む。

## 【0061】

保存的改変体：「保存的」アミノ酸置換は、HMW - MAAに対する抗体の親和性に実質的に影響を及ぼさないか、またはその親和性を低下させない置換である。例えば、HMW - MAAに特異的に結合するヒト抗体は、多くとも約1つ、多くとも約2つ、多くとも約5つ、多くとも (and most) 約10個または多くとも約15個の保存的置換を含み得、元のHMW - MAAポリペプチドに特異的に結合し得る。保存的バリエーションという用語は、抗体がHMW - MAAに特異的に結合するという条件で、置換されていない親アミノ酸の代わりに置換されたアミノ酸の使用も含む。非保存的置換は、HMW - MAAに対する活性または結合性を低下させる置換である。

20

## 【0062】

機能的に類似するアミノ酸を提供する保存的アミノ酸置換の表は、当業者に周知である。以下の6つの群が、互いに保存的置換であると考えられるアミノ酸の例である：

30

- 1) アラニン (A)、セリン (S)、トレオニン (T)；
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；
- 4) アルギニン (R)、リシン (K)；
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；および
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)

相補性決定領域 (CDR)：天然のIg結合部位の天然のFv領域の結合親和性および特異性を一体となって定義するアミノ酸配列。Igの軽鎖および重鎖の各々は、それぞれL - CDR 1、L - CDR 2、L - CDR 3およびH - CDR 1、H - CDR 2、H - CDR 3と命名された3つのCDRを有する。

40

## 【0063】

接触：直接的な物理的会合の配置；固体と液体の形態の両方を含む。

## 【0064】

細胞傷害性：生物の残りの細胞ではなく、標的化されることを意図された細胞に対する、免疫毒素などの分子の毒性。1つの実施形態では、対照的に、用語「毒性」とは、免疫毒素の標的化部分によって、標的化されることを意図された細胞以外の細胞に対する免疫毒素の毒性のことを指し、用語「動物毒性」とは、免疫毒素によって標的化されることを意図された細胞以外の細胞に対する免疫毒素の毒性による動物に対する免疫毒素の毒性のことを指す。

## 【0065】

縮重改変体：遺伝暗号の結果として縮重である配列を含む、HMW - MAAポリペプチ

50

ドまたはH M W - M A Aに結合する抗体をコードするポリヌクレオチド。20種の天然のアミノ酸が存在し、それらのほとんどが、2つ以上のコドンによって特定される。それゆえ、そのヌクレオチド配列によってコードされるH M W - M A AポリペプチドまたはH M W - M A Aに結合する抗体のアミノ酸配列が、変化しない限り、すべての縮重ヌクレオチド配列が含まれる。

【0066】

診断：病的状態（例えば、メラノーマ、乳癌、神経膠腫、頭頸部癌または前立腺癌であるがこれらに限定されない）の存在または性質を同定すること。診断方法は、感度および特異性の点で異なる。診断アッセイの「感度」は、陽性と検査された罹患個体のパーセンテージ（真陽性のパーセント）である。診断アッセイの「特異性」は、1 - 偽陽性率であり、ここで、偽陽性率は、陽性と検査された、疾患を有していない者の割合と定義される。特定の診断方法は、ある状態の確証診断を提供しないかもしれないが、その方法が診断に役立つ陽性の指標を提供する場合、それで足りる。「予後」は、乳癌または転移などの病的状態の発生の確率（例えば、重症度）である。

10

【0067】

エフェクター分子：キメラ分子が標的化する細胞に対して所望の効果を有するように意図されたキメラ分子の一部。エフェクター分子は、エフェクター部分（EM）、治療用薬剤もしくは診断用薬剤または類似の用語としても知られる。

【0068】

治療用薬剤には、化合物（例えば、核酸、タンパク質、ペプチド、アミノ酸もしくは誘導体、糖タンパク質、放射性同位体、脂質、炭水化物または組換えウイルス）が含まれる。核酸治療部分および核酸診断部分としては、アンチセンス核酸、一本鎖または二重鎖DNAとの共有結合性架橋のための誘導体化オリゴヌクレオチド、および三重鎖形成オリゴヌクレオチドが挙げられる。あるいは、抗H M W - M A A抗体などの標的化部分に連結される分子は、例えば、治療用組成物（例えば、薬物、核酸（例えば、アンチセンス核酸）または循環器系に対する直接的な曝露から遮蔽され得る別の治療的部分）を含むリボソームまたはミセルなどの被包系であり得る。抗体に付着されるリボソームを調製する手段は、当業者に周知である（例えば、米国特許第4,957,735号；およびConnorら、Pharm. Ther. 28:341-365, 1985を参照のこと）。診断用薬剤または診断用部分は、放射性同位体および他の検出可能な標識を含む。そのような目的のために有用な検出可能な標識もまた、当該分野で周知であり、それらとしては、放射性同位体（例えば、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{19}\text{F}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ および $^{125}\text{I}$ ）、フルオロフォア、化学発光剤および酵素が挙げられる。

20

30

【0069】

エピトープ：抗原決定基。これらは、抗原性である、すなわち、特異的免疫応答を誘発する、分子上の特定の化学基またはペプチド配列である。抗体は、H M W - M A Aなどのポリペプチド上の特定の抗原性エピトープに特異的に結合する。

【0070】

発現：タンパク質への核酸の翻訳。タンパク質は、発現されて、細胞内に留まり得るか、細胞表面膜の構成要素になり得るか、または細胞外マトリックスもしくは細胞外の媒質に分泌され得る。

40

【0071】

フレームワーク領域：CDRの間に挿入されたアミノ酸配列。フレームワーク領域には、可変軽鎖フレームワーク領域および可変重鎖フレームワーク領域が含まれる。フレームワーク領域は、抗原に結合するためにCDRを適切な向きに保持するように働く。

【0072】

神経膠腫：任意の発生状態における神経膠から構成される腫瘍。神経膠腫には、脳および脊髄のすべての内因性の新生物（例えば、星状細胞腫、上衣腫および乏突起膠腫）が含まれる。「低悪性度」神経膠腫は、十分に分化している（退形成でない）；これらは、良

50

性であり、患者に対して良好な予後を予示する。「高悪性度」神経膠腫は、未分化または退形成である；これらは、悪性であり、不良な予後を有する。

【0073】

HAMA（ヒト抗マウス抗体）応答：患者に投与されたマウス抗体の可変領域および定常領域に対するヒト被験体における免疫応答。抗体の反復投与は、患者の血清からの抗体のクリアランス速度を高め得、また、その患者においてアレルギー反応を誘発し得る。

【0074】

宿主細胞：ベクターを増殖し得、そのDNAを発現し得る、細胞。この細胞は、原核生物または真核生物の細胞であり得る。この用語は、対象宿主細胞の任意の子孫も含む。複製中に生じる変異が存在し得るので、すべての子孫が、親細胞と同一でないかもしれないことが理解される。しかしながら、用語「宿主細胞」が用いられるとき、そのような子孫が含まれる。

10

【0075】

免疫応答：刺激に対するB細胞、T細胞または単球などの免疫系の細胞の応答。1つの実施形態において、その応答は、特定の抗原に対して特異的である（「抗原特異的応答」）。1つの実施形態において、免疫応答は、CD4+応答またはCD8+応答などのT細胞応答である。別の実施形態において、その応答は、B細胞応答であり、それにより、特異的抗体の産生が生じる。

【0076】

免疫結合体：抗体またはその機能性フラグメントに対するエフェクター分子の共有結合。そのエフェクター分子は、検出可能な標識または免疫毒素であり得る。トキシンの具体的で非限定的な例としては、アブリン、リシン、Pseudomonas外毒素（PE、例えば、PE35、PE37、PE38およびPE40）、ジフテリア毒素（DT）、ボツリヌス毒素もしくはそれらの改変トキシン、あるいは細胞の成長を直接もしくは間接的に阻害するかまたは細胞を殺滅する他の有毒な薬剤が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、PEおよびDTは、代表的には肝臓毒性によって死をもたらす非常に有毒な化合物である。しかしながら、PEおよびDTは、そのトキシンの天然の標的化成分（例えば、PEのドメインIaおよびDTのB鎖）を除去すること、およびそれを抗体などの異なる標的化部分で置き換えることによって、免疫毒素として使用するための形態に改変され得る。「キメラ分子」は、エフェクター分子に結合体化（結合）されたりリガンドまたは抗体などの標的化部分である。用語「結合体化された」または「連結された」とは、2つのポリペプチドを1つの連続したポリペプチド分子にすることを指す。1つの実施形態において、抗体は、エフェクター分子に接着される。別の実施形態において、エフェクター分子に接着された抗体は、体内での半減期を延長するために、タンパク質もしくはペプチドに対して脂質または他の分子にさらに接着される。その結合は、化学的手段または組換え手段によるものであり得る。1つの実施形態において、その結合は、化学的結合であり、ここで、抗体部分とエフェクター分子との反応は、それらの2分子間に共有結合を形成することにより、1つの分子を形成する。必要に応じて、ペプチドリンカー（短いペプチド配列）が、抗体とエフェクター分子との間に含まれ得る。免疫結合体は、最初、別個の官能性を有する2分子（例えば、抗体およびエフェクター分子）から調製されたので、それらは、時折「キメラ分子」とも呼ばれる。ゆえに、用語「キメラ分子」は、本明細書中で使用される場合、エフェクター分子に結合体化（結合）された標的化部分（例えば、リガンドまたは抗体）のことを指す。

20

30

40

【0077】

免疫原性ペプチド：ペプチドがMHC分子に結合して、細胞傷害性Tリンパ球（「CTL」）応答、またはその免疫原性ペプチドが由来する抗原に対するB細胞応答（例えば、抗体産生）を誘導するような、対立遺伝子特異的モチーフまたは他の配列（例えば、N末端リピート）を含むペプチド。

【0078】

1つの実施形態において、免疫原性ペプチドは、配列モチーフまたは当該分野で公知の

50

他の方法（例えば、ニューラルネットまたは多項式判定（*polynomial determination*））を用いて同定される。代表的には、アルゴリズムを使用してペプチドの「結合閾値」が決定され、それによりある特定の親和性で結合する高確率をペプチドに付与するスコアを有し、かつ免疫原性であり得るペプチドが選択される。それらのアルゴリズムは、特定の位置における特定のアミノ酸のMHC結合性に対する影響、特定の位置における特定のアミノ酸の抗体結合性に対する影響、またはモチーフ含有ペプチドにおける特定の置換の結合性に対する影響に基づく。免疫原性ペプチドの文脈内において、「保存された残基」は、ペプチド内の特定の位置におけるランダム分布によって期待される頻度よりも著しく高い頻度で見られる残基である。1つの実施形態において、保存された残基は、MHC構造が免疫原性ペプチドとの接触点を提供し得る残基である。1つの具体的で非限定的な例において、免疫原性ポリペプチドは、HMW-MAAのある領域またはそのフラグメントを含み、ここで、そのポリペプチドは、完全長HMW-MAAポリペプチドを発現する宿主細胞の細胞表面上で発現される。

10

#### 【0079】

免疫原性組成物：HMW-MAAポリペプチドを発現する細胞に対して測定可能なCTL応答を誘導するか、またはHMW-MAAポリペプチドに対して測定可能なB細胞応答（例えば、抗体の産生）を誘導する、HMW-MAAポリペプチドなどのポリペプチドを含む組成物。免疫原性組成物は、サイトカイン産生も誘導し得る。免疫原性組成物とは、さらに、HMW-MAAポリペプチドを発現するために使用され得る（ゆえに、このポリペプチドに対する免疫応答を誘発するために使用され得る）HMW-MAAポリペプチドをコードする単離された核酸のことを指す。インビトロで使用する場合、免疫原性組成物は、単離されたタンパク質またはペプチドエピトープからなり得る。インビボで使用する場合、免疫原性組成物は、代表的には、薬学的に許容可能なキャリア中のタンパク質もしくは免疫原性ペプチド、および/または他の薬剤を含む。HMW-MAAポリペプチドなどの任意の特定のペプチドまたはそのポリペプチドをコードする核酸は、当該分野において認められているアッセイによって、CTL応答またはB細胞応答を誘導する能力について容易に試験され得る。免疫原性組成物は、当業者に周知のアジュバントを含み得る。

20

#### 【0080】

免疫学的に反応性の条件：特定のエピトープに対して産生された抗体が、実質的にすべての他のエピトープに対する結合よりも検出可能に高い程度で、および/またはその結合を実質的に除外して、そのエピトープに結合することを可能にする条件に対する言及を含む。免疫学的に反応性の条件は、抗体結合反応の形式に依存し、代表的には、イムノアッセイプロトコルまたはインビボにおいて遭遇する条件において利用される条件である。イムノアッセイの形式および条件の説明については、Harlow & Lane, 前出を参照のこと。それらの方法において使用される免疫学的に反応性の条件は、生存している哺乳動物内または哺乳動物細胞内において代表的な条件（例えば、温度、オスモル濃度およびpH）に対する言及を含む「生理学的条件」である。一部の器官が極端な条件に供されることが認識されるが、生物内および細胞内の環境は、通常、およそpH7（すなわち、pH6.0~pH8.0、より代表的には、pH6.5~7.5）になっており、主要な溶媒として水を含み、0より高く50より低い温度にある。オスモル濃度は、細胞の生存能および増殖を支える範囲内である。

30

40

#### 【0081】

単離：「単離された」生物学的成分（例えば、核酸、タンパク質（抗体を含む）または細胞小器官）は、その成分が天然に存在する環境（例えば、細胞）内の他の生物学的成分、すなわち、他の染色体および染色体外のDNAおよびRNA、タンパク質ならびに細胞小器官から実質的に分離されているか、または精製されている。「単離」されている核酸およびタンパク質には、標準的な精製法によって精製された核酸およびタンパク質が含まれる。この用語は、宿主細胞内での組換え発現によって調製された核酸およびタンパク質、ならびに化学的に合成された核酸も包含する。

#### 【0082】

50

標識：その分子の検出を容易にする別の分子（例えば、抗体またはタンパク質）に直接または間接的に結合体化される検出可能な化合物または組成物。標識の具体的で非限定的な例としては、蛍光タグ、酵素の結合および放射性同位体が挙げられる。1つの例において、「標識された抗体」とは、その抗体内における別の分子の組み込みのことを指す。例えば、その標識は、検出可能なマーカー（例えば、放射標識されたアミノ酸の組み込み、またはマークされたアビジン（例えば、光学的方法または比色法によって検出され得る蛍光マーカーまたは酵素活性を含むストレプトアビジン）によって検出され得るビオチニル部分のポリペプチドへの付着）である。ポリペプチドおよび糖タンパク質を標識する様々な方法が、当該分野で公知であり、それらが使用され得る。ポリペプチド用の標識の例としては、以下：放射性同位体または放射性ヌクレオチド（例えば、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{18}\text{O}$ 、 $^{19}\text{F}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ および $^{125}\text{I}$ ）、蛍光標識（例えば、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ローダミン、ランタニドリン光体）、酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光マーカー、ビオチニル基、2次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、2次抗体用の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）、または磁性物質（例えば、ガドリニウムキレート）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、標識は、潜在的な立体障害を減少させるために様々な長さのスペーサーアームに付着される。

10

20

#### 【0083】

リンカー：いくつかの場合において、リンカーは、可変重鎖を可変軽鎖に間接的に結合するように働く抗体結合フラグメント（例えば、Fvフラグメント）内のペプチドである。「リンカー」とは、抗体などの標的化部分を、細胞毒または検出可能な標識などのエフェクター分子に結合するように働くペプチドのことも指し得る。

#### 【0084】

用語「結合体化する」、「接着する」、「結合する」または「連結する」とは、2つのポリペプチドを1つの連続したポリペプチド分子にすること、または放射性核種もしくは他の分子をscFvなどのポリペプチドに共有結合的に付着することを指す。特定の文脈において、これらの用語は、抗体部分などのリガンドをエフェクター分子に接着することについての言及を含む。その結合は、化学的手段または組換え手段によるものであり得る。「化学的手段」とは、抗体部分とエフェクター分子との間の反応（それにより、それらの2分子間に共有結合が形成され、1つの分子が形成される）のことを指す。

30

#### 【0085】

哺乳動物：この用語には、ヒトと非ヒト哺乳動物の両方が含まれる。同様に、用語「被験体」は、ヒトと動物被験体の両方を包含する。

#### 【0086】

主要組織適合遺伝子複合体（MHC）：ヒト白血球抗原（「HLA」）を含む、様々な種において報告された組織適合性抗原系を包含することを意味する総称。用語「モチーフ」とは、特定のMHC対立遺伝子によって認識される規定の長さ（通常、約8～約11アミノ酸）のペプチドにおける残基のパターンのことを指す。そのペプチドモチーフは、代表的には、各MHC対立遺伝子によって異なるものであり、高度に保存された残基および結合に関わらない残基のパターンが異なる。

40

#### 【0087】

メラノーマ：メラノサイト（メラニン色素を生成する細胞）に由来する癌の形態。メラノサイトは、主に皮膚に見られるが、腸および眼にも存在する。皮膚におけるメラノーマには、表在拡大型黒色腫、結節性黒色腫、末端部黒子様黒色腫および悪性黒子（メラノーマ）が含まれる。上記タイプのいずれもが、メラニンを生成し得るか、またはメラニン欠乏であり得る。同様に、任意のサブタイプが、高悪性度の挙動および局所的再発の傾向のマーカーである線維形成（神経向性を有する高密度線維反応）を示し得る。他のメラノーマとしては、明細胞肉腫、粘膜黒色腫（mucosal melanoma）およびブド

50

ウ膜黒色腫が挙げられる。

【0088】

予後に影響を及ぼす特徴は、腫瘍の厚さ（単位はミリメートル）（ブレスロー深度（*Breslow's depth*））、皮膚構造に関連する深度（クラークレベル）、メラノーマのタイプ、潰瘍の存在、リンパ管浸潤／神経周囲浸潤の存在、腫瘍浸潤リンパ球の存在（存在する場合、予後は良好）、病変の位置、衛星病変の存在、および局所転移または遠隔転移の存在である。メラノーマがリンパ節に広がっているとき、最も重要な因子の1つは、悪性腫瘍を有する結節の数である。結節内の悪性腫瘍の範囲もまた重要である；悪性腫瘍が微視的にすぎない微小転移巣は、巨視的転移（*macrometastases*）よりも好ましい予後を有する。遠隔転移が存在するとき、5年生存率は、10パーセント未満である；生存期間中央値は、6～12ヶ月である。皮膚および肺への転移は、より良好な予後を有する。脳、骨および肝臓への転移は、不良な予後に関連する。

10

【0089】

メラノーマは、以下のとおりステージ分けされ得る：

ステージ0：上皮内黒色腫（クラークレベルI）、100%生存。

【0090】

ステージI / II：侵襲性メラノーマ、85～95%生存。

【0091】

T1a：1.00mm未満の原発性、潰瘍なし、クラークレベルII～III。

【0092】

T1b：1.00mm未満の原発性、潰瘍ありまたはクラークレベルIV～V。

20

【0093】

T2a：1.00～2.00mmの原発性、潰瘍なし。

【0094】

ステージII：高リスクメラノーマ、40～85%生存。

【0095】

T2b：1.00～2.00mmの原発性、潰瘍あり。

【0096】

T3a：2.00～4.00mmの原発性、潰瘍なし。

【0097】

T3b：2.00～4.00mmの原発性、潰瘍あり。

30

【0098】

T4a：4.00mm以上の原発性、潰瘍なし。

【0099】

T4b：4.00mm以上の原発性、潰瘍あり。

【0100】

ステージIII：局所性の転移、25～60%生存。

【0101】

N1：1つの陽性リンパ節。

【0102】

N2：2～3つの陽性リンパ節または局所性の皮膚／移動中転移巣（*In Transit Metastases*）。

40

【0103】

N3：4つの陽性リンパ節またはリンパ節および局所性の皮膚／移動中転移巣。

【0104】

ステージIV：遠隔転移、9～15%生存。

【0105】

M1a：遠位皮膚転移、正常な乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）。

【0106】

M1b：肺転移、正常なLDH。

50

## 【0107】

M1c：他の遠隔転移または高LDHを有する任意の遠隔転移。

## 【0108】

モノクローナル抗体：Bリンパ球の単クローンまたは単一抗体の軽鎖遺伝子および重鎖遺伝子がトランスフェクトされた細胞によって産生される抗体。モノクローナル抗体は、当業者に公知の方法、例えば、ミエローマ細胞と免疫脾臓細胞との融合からハイブリッド抗体形成細胞を作製することによって生成される。モノクローナル抗体には、ヒト化モノクローナル抗体および完全ヒトモノクローナル抗体が含まれる。本明細書中で使用される場合、モノクローナル抗体には、抗体フラグメント（例えば、scFv、Fv、dsRvまたはFabであるがこれらに限定されない）が含まれる。

10

## 【0109】

新形成、悪性腫瘍、癌または腫瘍：細胞の異常な成長および制御されない成長の結果。新形成、悪性腫瘍、癌および腫瘍は、しばしば交換可能に使用される。個体における腫瘍の量は、腫瘍の数、体積または重量として測定され得る「全身腫瘍組織量（tumor burden）」である。転移しない腫瘍は、「良性」と呼ばれる。周囲組織を浸潤する腫瘍および/または転移し得る腫瘍は、「悪性」と呼ばれる。血液学的腫瘍の例としては、急性白血病（例えば、11q23陽性急性白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄球性白血病、急性骨髄性白血病、ならびに骨髄芽球性白血病、前骨髄球性白血病、骨髄単球性白血病、単球性白血病および赤白血病）、慢性白血病（例えば、慢性骨髄性（顆粒球性）白血病、慢性骨髄性白血病および慢性リンパ性白血病）、真性多血症、リンパ腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫（低悪性度および高悪性度の形態）、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、重鎖病、骨髄異形成症候群、ヘアリーセル白血病および骨髄形成異常を含む白血病が挙げられる。

20

## 【0110】

肉腫および癌腫などの固形腫瘍の例としては、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫および他の肉腫、滑膜腫（synovialoma）、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌腫、リンパ系悪性腫瘍、膀胱癌、乳癌（基底細胞型（basal）乳癌腫、腺管癌腫および小葉性乳癌腫を含む）、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、肝細胞癌腫、扁平上皮癌腫、基底細胞癌腫、腺癌腫、汗腺癌腫、甲状腺髄様癌腫、甲状腺乳頭癌腫、褐色細胞腫、脂腺癌腫、乳頭状癌腫、乳頭状腺癌腫、髄様癌腫、気管支原性癌腫、腎細胞癌腫、ヘパトーム、胆管癌腫、絨毛癌腫、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、セミノーマ、膀胱癌腫およびCNS腫瘍（例えば、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫（cranio-pharyngioma）、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫（meningioma）、メラノーマ、神経芽細胞腫および網膜芽細胞腫）が挙げられる。

30

## 【0111】

いくつかの例において、腫瘍は、メラノーマ、乳癌、前立腺癌、神経膠腫または扁平上皮癌腫、例えば、頭頸部癌である。

## 【0112】

核酸：ホスホジエステル結合を介して連結されるヌクレオチド単位（リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、関連する天然に存在する構造上の改変体およびそれらの合成の天然に存在しないアナログ）、関連する天然に存在する構造上の改変体およびそれらの合成の天然に存在しないアナログから構成されるポリマー。したがって、この用語には、ヌクレオチドおよびそれらの間の結合が、天然に存在しない合成アナログ（例えば、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラル-メチルホスホネート、2-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸（PNA）などであるが、これらに限定されない）を含む、ヌクレオチドポリマーが含まれる。そのようなポリヌクレオチドは、例えば、自動DNA合成装置を用いて合成され得る。用語「オリゴヌクレオチド」とは、代表的には、一般に、約50ヌクレオチドを超えない短いポリヌクレオチドのことを指す。ヌクレオチド配列が、DNA配列（すなわち、A、T、G、C）によって表され

40

50

るとき、このヌクレオチド配列は、「U」が「T」に取って代わるRNA配列（すなわち、A、U、G、C）も含むと理解される。

【0113】

ヌクレオチド配列を記載するために、従来を表記法が本明細書中で使用される：一本鎖ヌクレオチド配列の左側の末端が、5'末端であり；二本鎖ヌクレオチド配列の左側の方向が、5'方向と呼ばれる。新生のRNA転写物に対するヌクレオチドの5'から3'への付加の方向が、転写方向と呼ばれる。mRNAと同じ配列を有するDNA鎖が、「コーディング鎖」と呼ばれ；そのDNAから転写されたmRNAと同じ配列を有するDNA鎖の配列であり、かつRNA転写物の5'末端に対して5'に位置する配列が、「上流配列」と呼ばれ；RNAと同じ配列を有するDNA鎖の配列であり、かつコードRNA転写物の3'末端に対して3'である配列が、「下流配列」と呼ばれる。

10

【0114】

「cDNA」とは、mRNAと相補的または同一である、一本鎖または二本鎖の形態のDNAのことを指す。

【0115】

「コードする」とは、規定の配列のヌクレオチド（すなわち、rRNA、tRNAおよびmRNA）または規定の配列のアミノ酸を有する、生物学的プロセスにおいて他のポリマーおよび高分子の合成するための鋳型として機能するポリヌクレオチド（例えば、遺伝子、cDNAまたはmRNA）としてのヌクレオチドの特異的配列の固有の特性、およびそれらからもたらされる生物学的特性のことを指す。したがって、ある遺伝子によって生成されるmRNAの転写および翻訳が、細胞または他の生体系においてタンパク質を生成する場合、その遺伝子は、タンパク質をコードする。コーディング鎖（そのヌクレオチド配列は、mRNA配列と同一であり、通常、配列表に提供されている）と非コーディング鎖（遺伝子またはcDNAの転写のために鋳型として使用されるもの）の両方が、タンパク質またはその遺伝子もしくはcDNAの他の産物をコードすると呼ばれ得る。別段明記されない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いの縮重バージョンであって同じアミノ酸配列をコードする、すべてのヌクレオチド配列を含む。タンパク質およびRNAをコードするヌクレオチド配列は、イントロンを含み得る。

20

【0116】

「組換え核酸」とは、天然には共に連結されていないヌクレオチド配列を有する核酸のことを指す。これには、適当な宿主細胞を形質転換するために使用され得る増幅された核酸または組み立てられた核酸を含む核酸ベクターが含まれる。組換え核酸を含む宿主細胞は、「組換え宿主細胞」と呼ばれる。次いで、その組換え宿主細胞内で遺伝子が発現されることにより、「組換えポリペプチド」などが生成される。組換え核酸は、非コード機能も果たし得る（例えば、プロモーター、複製起点、リボソーム結合部位など）。

30

【0117】

その配列が第1の配列であるポリヌクレオチドが、その配列が第2の配列であるポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズする場合、その第1の配列は、第2の配列に対して「アンチセンス」である。

【0118】

2つ以上のヌクレオチド配列間またはアミノ酸配列間の配列の関係性を記載するために使用される用語としては、「参照配列」、「～から選択される」、「比較ウィンドウ（comparison window）」、「同一」、「配列同一性のパーセンテージ」、「実質的に同一」、「相補的」および「実質的に相補的」が挙げられる。

40

【0119】

核酸配列の配列比較について、代表的には1つの配列が、試験配列と比較される参照配列となる。配列比較アルゴリズムを用いるとき、試験配列および参照配列を、コンピュータに入力し、必要であれば部分列座標（subsequence coordinate）を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。デフォルトのプログラムパラメータが使用される。比較のための配列のアラインメント方法は、当該分野で周知

50

である。比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981の局所相同性アルゴリズム、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443, 1970の相同性アラインメントアルゴリズム、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444, 1988の類似度検索法、これらのアルゴリズム (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIにおけるGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA)のコンピュータ化された実行、または手動によるアラインメントおよび目視検査 (例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubelら、eds 1995補遺)を参照のこと)によって行われ得る。

10

## 【0120】

有用なアルゴリズムの1つの例は、PILEUPである。PILEUPは、Feng & Doolittle, J. Mol. Evol. 35: 351-360, 1987のプログレッシブ・アラインメント法の簡略法を用いる。使用される方法は、Higgins & Sharp, CABIOS 5: 151-153, 1989によって記載された方法と類似している。PILEUPを用い、以下のパラメータ: デフォルトのギャップウェイト (gap weight) (3.00)、デフォルトのギャップ長ウェイト (gap length weight) (0.10) および重み付けエンドギャップ (weighted end gaps) を使用して、参照配列を他の試験配列と比較することにより、パーセント配列同一性関係が決定される。PILEUPは、バージョン7.0などのGCG配列解析ソフトウェアパッケージ (Devereauxら、Nuc. Acids Res. 12: 387-395, 1984から得ることができる。

20

## 【0121】

パーセント配列同一性および配列類似性の決定に適したアルゴリズムの別の例は、BLASTおよびBLAST2.0アルゴリズムであり、これらは、Altschulら、J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990およびAltschulら、Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997に説明されている。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を通じて公的に入手可能である。BLASTNプログラム (ヌクレオチド配列用) は、デフォルトとして、11というワード長 (W)、50というアラインメント (B)、10という期待値 (E)、M = 5、N = -4および両方の鎖の比較を用いる。BLASTPプログラム (アミノ酸配列用) は、デフォルトとして、3というワード長 (W) および10という期待値 (E) ならびにBLOSUM62スコア行列を用いる (Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915, 1989を参照のこと)。

30

## 【0122】

オリゴヌクレオチド: 最大約100ヌクレオチド塩基長の線状のポリヌクレオチド配列。

40

## 【0123】

オープンリーディングフレーム (ORF): いずれの終止コドンも含まない、アミノ酸をコードする一続きのヌクレオチドトリプレット (コドン)。これらの配列は、通常、ペプチドに翻訳可能である。

## 【0124】

作動可能に連結: 第1の核酸配列が、第2の核酸配列と機能的な関係として配置される時、その第1の核酸配列は、第2の核酸配列に作動可能に連結される。例えば、CMVプロモーターなどのプロモーターが、コード配列の転写または発現に影響する場合、そのプロモーターは、コード配列に作動可能に連結される。一般に、同じ読み枠で2つのタン

50

パク質コード領域を連結する必要がある場合、作動可能に連結されるDNA配列は、連続している。

【0125】

医薬品：被験体または細胞に適切に投与されたときに所望の治療効果または予防効果を誘導することができる化学的化合物または化学的組成物。

【0126】

薬学的に許容可能なキャリア：有用な薬学的に許容可能なキャリアは、従来のものである。Remington's Pharmaceutical Sciences, E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition, 1975には、本明細書中に開示される融合タンパク質の薬学的送達に適した組成物および製剤が記載されている。

10

【0127】

一般に、キャリアの性質は、使用される特定の投与様式に依存する。例えば、非経口製剤は、通常、ビヒクルとして薬学的および生理的に許容可能な流体（例えば、水、生理食塩水、平衡塩類溶液、水溶性デキストロス、グリセロールなど）を含む注射可能な流体を含む。固体組成物（例えば、散剤、丸剤、錠剤またはカプセルの形態）については、従来の無毒性固体キャリアは、例えば、製薬グレードのマニトール、ラクトース、デンプンまたはステアリン酸マグネシウムを含み得る。投与される薬学的組成物は、生物学的に中性のキャリアに加えて、少量の無毒性の補助剤物質（例えば、湿潤剤または乳化剤、保存剤およびpH緩衝剤など、例えば、酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレート）を含み得る。

20

【0128】

ポリヌクレオチド：ポリヌクレオチドまたは核酸配列という用語は、少なくとも10塩基長のヌクレオチドの重合体型のことを指す。組換えポリヌクレオチドは、それが由来する生物の天然に存在するゲノムにおいて直接隣接する（一方は5'末端およびもう一方は3'末端に隣接する）両方のコード配列と直接隣接しないポリヌクレオチドを含む。それゆえ、この用語は、例えば、ベクター；自己複製プラスミドもしくは自己複製ウイルス；または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNAに組み込まれた組換えDNA、あるいは他の配列から独立した別個の分子（例えば、cDNA）として存在する組換えDNAを含む。ヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドまたはいずれかのヌクレオチドの改変型であり得る。この用語は、一本鎖および二本鎖の形態のDNAを含む。

30

【0129】

ポリペプチド：長さまたは翻訳後修飾（例えば、グリコシル化またはリン酸化）に関係なく、アミノ酸の任意の鎖。1つの実施形態において、ポリペプチドは、HMW-MAAポリペプチドである。「残基」とは、アミド結合またはアミド結合模倣物によってポリペプチドに組み込まれているアミノ酸またはアミノ酸模倣物のことを指す。ポリペプチドは、アミノ末端（N末端）およびカルボキシ末端（C末端）を有する。

【0130】

疾患を予防するか、処置するかまたは回復させる：疾患を「予防する」とは、疾患の完全な発生を阻害することを指す。「処置する」とは、疾患または病的状態が発症し始めた後にそれらの徴候または症状を回復させる治療的介入（例えば、全身腫瘍組織量の減少または転移のサイズの数の減少）のことを指す。「回復させる」とは、癌などの疾患の徴候または症状の数または重症度の減少のことを指す。

40

【0131】

プローブおよびプライマー：プローブは、検出可能な標識またはレポーター分子に付着された、単離された核酸を含む。プライマーは、短い核酸、好ましくは、DNAオリゴヌクレオチド、15ヌクレオチドまたはそれ以上の長さである。プライマーは、核酸ハイブリダイゼーションによって相補的な標的DNA鎖にアニールされて、プライマーと標的DNA鎖とのハイブリッドを形成し、次いで、DNAポリメラーゼ酵素によって標的DNA

50

鎖に沿って伸長し得る。プライマー対は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）または当該分野で公知の他の核酸増幅方法による核酸配列の増幅のために使用され得る。当業者は、特定のプローブまたはプライマーの特異性が、その長さに伴って増加することを認識する。したがって、例えば、連続した20ヌクレオチドを含むプライマーは、たった15ヌクレオチドの対応するプライマーよりも高い特異性で標的にアニールする。ゆえに、より高い特異性を得るために、20、25、30、35、40、50またはそれ以上連続したヌクレオチドを含むプローブおよびプライマーが選択され得る。

#### 【0132】

プロモーター：プロモーターは、核酸の転写を指示する核酸調節配列の配列である。プロモーターは、転写開始部位付近の必須の核酸配列、例えば、ポリメラーゼII型プロモーターの場合はTATAエレメントを含む。プロモーターは、転写開始部位から数千塩基対も離れて位置し得る遠位のエンハンサーまたはリプレッサーエレメントも必要に応じて含む。構成的プロモーターと誘導性プロモーターの両方が含まれる（例えば、Bitterら、Methods in Enzymology 153:516-544, 1987を参照のこと）。

10

#### 【0133】

プロモーターの具体的で非限定的な例としては、哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）が挙げられるか、または哺乳動物ウイルス（例えば、レトロウイルス末端反復配列；アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）が使用され得る。組換えDNA法または合成手法によって生成されたプロモーターもまた、使用され得る。ポリヌクレオチドは、挿入される宿主の遺伝子配列の効率的な転写を促進するプロモーター配列を含む発現ベクターに挿入され得る。発現ベクターは、代表的には、複製起点、プロモーター、ならびに形質転換された細胞の表現型選択を可能にする特異的な核酸配列を含む。

20

#### 【0134】

前立腺癌：男性生殖系における腺である前立腺の組織に形成される癌のタイプ。前立腺癌は、腺癌腫、すなわち、正常な精液分泌前立腺細胞が癌細胞に変異して始まる腺の癌として分類される。その腺癌腫が最も一般的である前立腺の領域は、辺縁部である。初期には、上皮内癌腫または前立腺上皮内新形成（PIN）として知られる状態である、他の正常な前立腺に局限する癌細胞の小さい凝集塊が存在する。PINが癌前駆体であるという証明は存在しないが、PINは、癌に密接に関連する。やがてこれらの癌細胞は、増殖し始め、腫瘍を形成する周囲の前立腺組織（支質）に広がる。最終的には、その腫瘍は、近くの器官（例えば、精嚢または直腸）を浸潤するのに十分な大きさに成長し得るか、またはその腫瘍細胞は、血流およびリンパ系を遊走する能力を獲得し得る。前立腺癌は、身体の他の部分を浸潤し得る細胞塊であるので、悪性腫瘍と考えられる。前立腺癌は、通常、骨、リンパ節、直腸および膀胱に転移する。

30

#### 【0135】

前立腺癌は、以下のとおりステージ分けされ得る：

ステージ0：腫瘍のエビデンスなし。

#### 【0136】

ステージI：腫瘍が存在するが、臨床的にまたはイメージングで検出可能でない。

40

#### 【0137】

T1a：腫瘍は、切除された前立腺組織の5%未満で偶発的に見られた。

#### 【0138】

T1b：腫瘍は、切除された前立腺組織の5%超で偶発的に見られた。

#### 【0139】

T1c：腫瘍は、血清前立腺特異抗原（PSA）が高いことを理由に実施された針生検において見られた。

#### 【0140】

ステージII：腫瘍は、検査時にさわって感じられ得る（触診され得る）が、前立腺の

50

外に広がっていない。

【0141】

T2a：腫瘍は、前立腺の2つの葉のうちの1つの半分または半分未満である。

【0142】

T2b：腫瘍は、両方ではなく一方の葉の半分より大きい。

【0143】

T2c：腫瘍は、両方の葉に存在する。

【0144】

ステージIII：腫瘍は、前立腺被膜を通過して広がっている。

【0145】

T3a：腫瘍は、片側または両側の被膜を通過して広がっている。

【0146】

T3b：腫瘍は、片方または両方の精嚢を浸潤している。

【0147】

ステージIV：腫瘍は、他の近くの構造を浸潤している。

【0148】

精製：精製という用語は、絶対的な純度を要求しない；むしろ、相対的な用語として意図される。したがって、例えば、精製されたペプチド調製物は、ペプチドまたはタンパク質が細胞内の天然の環境に存在するよりも多くそのペプチドまたはタンパク質が濃縮されている調製物である。1つの実施形態において、ある調製物は、そのタンパク質またはペプチドが、その調製物のペプチドまたはタンパク質含有量全体の少なくとも50%であるように精製される。

【0149】

本明細書中に開示されるHMW-MAAポリペプチドまたはHMW-MAAに特異的に結合する抗体は、当該分野で公知の手段のいずれかによって精製され得る。例えば、Guide to Protein Purification, ed. Deutscher, Meth. Enzymol. 185, Academic Press, San Diego, 1990；およびScopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer Verlag, New York, 1982を参照のこと。実質的な精製とは、他のタンパク質または細胞成分からの精製のことを表す。実質的に精製されたタンパク質は、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%または98%純粋である。したがって、1つの具体的で非限定的な例において、実質的に精製されたタンパク質は、他のタンパク質または細胞成分を90%含まない。

【0150】

組換え：組換え核酸は、天然に存在しない配列を有するか、または2つの別の分離された配列セグメントの人工的な組み合わせによって作製された配列を有する、核酸である。この人工的な組み合わせは、しばしば、化学的合成、またはより一般的には、単離された核酸セグメントの人工的操作、例えば、遺伝子操作法によって、達成される。

【0151】

組換えトキシン：細胞標的化部分がトキシンに融合されているキメラタンパク質(Pastanら、Science, 254: 1173-1177, 1991)。細胞標的化部分が、抗体のFv部分である場合、その分子は、組換え免疫毒素と呼ばれる(Chaudharyら、Nature, 339: 394-397, 1989)。トキシン部分は、ほとんどの正常細胞上に存在するトキシンレセプターに結合することができないように遺伝的に変更される。組換え免疫毒素は、抗原結合ドメインによって認識される細胞を選択的に殺滅する。これらの組換えトキシンおよび免疫毒素は、癌、例えば、HMW-MAAを発現する癌を処置するために使用され得る。

【0152】

配列同一性：別では配列同一性と呼ばれるアミノ酸配列間の類似性は、配列間の類似性

10

20

30

40

50

に関して表現される。配列同一性は、しばしばパーセンテージ同一性（または類似性または相同性）に関して測定される；そのパーセンテージが高いほど、2つの配列は、似ている。ポリペプチドのホモログまたは改変体は、標準的な方法を用いて整列されるとき、相対的に高い程度の配列同一性を有する。

#### 【0153】

比較するための配列のアラインメント方法は、当該分野で周知である。様々なプログラムおよびアラインメントアルゴリズムが：Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, 1988; Higgins and Sharp, Gene 73:237, 1988; Higgins and Sharp, CABIOS 5:151, 1989; Corpetら、Nucleic Acids Research 16:10881, 1988; および Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, 1988に記載されている。Altschulら、Nature Genet. 6:119, 1994には、配列アラインメント方法および相同性計算に関する詳細な考慮すべき点が示されている。

10

#### 【0154】

NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschulら、J. Mol. Biol. 215:403, 1990)は、配列解析プログラムblastp、blastn、blastx、tblastn およびtblastxと関連して使用するために、National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD)をはじめとしたいくつかの供給源から、ならびにインターネット上で、入手可能である。このプログラムを用いて配列同一性を決定する方法の説明は、インターネットのNCBIウェブサイト上で入手可能である。

20

#### 【0155】

HMW-MAAポリペプチドに特異的に結合する抗体の $V_L$ または $V_H$ のホモログおよび改変体は、代表的には、デフォルトパラメータに設定された、ギャップblastpであるNCBI Blast 2.0を使用して、抗体のアミノ酸配列との完全長アラインメントに対して計算される、少なくとも約75%、例えば、少なくとも約80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を保持することを特徴とする。約30を超えるアミノ酸のアミノ酸配列を比較する場合、デフォルトのパラメータ(11というギャップ存在コスト(gap existence cost)および1という残基あたりギャップコスト)に設定されたデフォルトのBLOSUM62行列を用いたBlast 2配列関数を使用する。短いペプチド(およそ30アミノ酸未満)をアラインメントするとき、そのアラインメントは、デフォルトのパラメータ(オープンギャップ9ペナルティ、伸長ギャップ1ペナルティ)に設定されたPAM30行列を用いたBlast 2配列関数を使用して行われるべきである。参照配列とより高い類似性を有するタンパク質は、この方法によって評価されるとき、高いパーセンテージ同一性(例えば、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性)を示す。配列全体より短い配列が、配列同一性について比較されるとき、ホモログおよび改変体は、代表的には、10~20アミノ酸という短い範囲にわたって少なくとも80%の配列同一性を有し、参照配列に対する類似性に応じて、少なくとも85%または少なくとも90%または95%という配列同一性を有し得る。そのような短い範囲にわたる配列同一性を決定するための方法は、インターネット上のNCBIウェブサイトにおいて入手可能である。当業者は、これらの配列同一性の範囲が、指針としてのみ提供されることを認識するだろう；提供される範囲に入らない非常に著しいホモログが得られ得ることは、全体的にあり得ることである。

30

40

#### 【0156】

50

特異的に結合する作用物質：実質的に、規定された標的にだけ結合する作用物質。したがって、H M W - M A A に特異的に結合する作用物質は、H M W - M A A ポリペプチドに実質的に結合する作用物質である。H M W - M A A に特異的に結合する作用物質は、他の無関係なタンパク質に実質的に結合しない。1つの実施形態において、特異的に結合する作用物質は、H M W - M A A ポリペプチドに特異的に結合するヒトモノクローナル抗体である。

【0157】

用語「特異的に結合する」とは、H M W - M A A などの抗原に関して、抗体または他のリガンドと、その抗原を有する細胞または組織との全体的または部分的な優先的会合、ならびにその抗原を有しない細胞または組織に会合しないことを指す。ある程度 of 非特異的な相互作用が、分子と非標的細胞または非標的組織との間に生じ得ることが認識される。それにもかかわらず、特異的結合は、抗原の特異的認識によって媒介されるとき、区別され得る。選択的に反応性である抗体は、抗原に結合するが、それらは、低親和性で抗原に結合し得る。他方、特異的結合は、抗体（または他のリガンド）と抗原を有する細胞との間に、結合される抗体（または他のリガンド）とその抗原を有しない細胞との間の会合よりも強い会合をもたらす。特異的結合は、代表的には、H M W - M A A ポリペプチドを有しない細胞または組織と比べて、そのポリペプチドを有する細胞または組織に対して結合される抗体または他のリガンドの量（単位時間あたり）の2倍超、例えば、5倍超、10倍超または100倍超の増加をもたらす。そのような条件下でのタンパク質への特異的な結合は、特定のタンパク質に対する特異性について選択された抗体を必要とする。種々のイムノアッセイ形式が、特定のタンパク質と特異的に免疫反応性である抗体または他のリガンドを選択するために適切である。例えば、タンパク質と特異的に免疫反応性であるモノクローナル抗体を選択するために、固相E L I S A イムノアッセイが日常的に使用される。特異的免疫反応性を測定するために使用され得るイムノアッセイの形式および条件の説明については、Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York (1988)を参照のこと。

10

20

【0158】

扁平上皮癌腫：皮膚、眼、様々な内部器官の表面、ならびに中空器官およびいくつかの腺管の裏打ちを形成する薄く平らな細胞である扁平上皮細胞に由来する癌のタイプ。扁平上皮癌腫は、類表皮癌腫とも呼ばれる。扁平上皮癌腫の1つのタイプは、頭頸部（head and neck head）扁平上皮癌腫（HNSCC）である。頭頸部扁平上皮癌腫には、鼻腔、洞、口唇、口腔、唾液腺、のどおよび喉頭の癌が含まれる。HNSCCは、以下のとおりステージ分けされ得る：

30

ステージ0：腫瘍のエビデンスなし。

【0159】

ステージI：腫瘍の最大径が、2cm以下である；限局的なリンパ節の関与または遠隔転移のエビデンスなし。

【0160】

ステージII：腫瘍は、2cmを超えるが、4cmより大きくない；限局的なリンパ節の関与または遠隔転移のエビデンスなし。

40

【0161】

ステージIII：腫瘍は、4cmより大きい；場合によっては、腫瘍はリンパ節に広がっている；遠隔転移のエビデンスなし。

【0162】

ステージIV：腫瘍は、リンパ節に広がっている；場合によっては、遠位への転移が存在する。

【0163】

被験体：ヒトと動物の被験体（ヒトおよび非ヒト哺乳動物を含む）の両方を含むカテゴリである、生存している多細胞脊椎動物。

50

## 【0164】

治療有効量：処置される被験体において所望の効果を達成するのに十分な特異的物質の量。例えば、これは、腫瘍の成長を阻害するかまたは抑制するのに必要な量であり得る。1つの実施形態において、治療有効量は、腫瘍を除去するのに必要な量である。被験体に投与されるとき、所望のインビトロ効果を達成すると示された標的組織濃度（例えば、腫瘍における濃度）を達成する投薬量が、一般に使用される。

## 【0165】

トキシン：細胞に対して細胞傷害性である分子。トキシンとしては、アブリン、リシン、Pseudomonas外毒素（PE）、ジフテリア毒素（DT）、ボツリヌス毒素、サポリン、レストリクトシン（restrictocin）もしくはゲロニン（gelonin）またはそれらの改変トキシンが挙げられる。例えば、PEおよびDTは、代表的には肝臓毒性によって死をもたらす非常に有毒な化合物である。しかしながら、PEおよびDTは、そのトキシンの天然の標的化成分（例えば、PEのドメインIaまたはDTのB鎖）を除去すること、およびそれを抗体などの異なる標的化部分で置き換えることによって、免疫毒素として使用するための形態に改変され得る。

10

## 【0166】

形質導入：形質導入された細胞は、分子生物学手法によって核酸分子を導入された細胞である。本明細書中で使用される場合、形質導入という用語は、ウイルスベクターを用いたトランスフェクション、プラスミドベクターを用いた形質転換、ならびにエレクトロポレーション、リポフェクションおよびパーティクルガン法（particle gun acceleration）による裸のDNAの導入をはじめとした、核酸分子をそのような細胞に導入し得るすべての手法を包含する。

20

## 【0167】

ベクター：宿主細胞に導入されることにより、形質転換された宿主細胞をもたらす核酸分子。ベクターは、複製起点などの宿主細胞内での複製を可能にする核酸配列を含み得る。ベクターは、1つ以上の選択可能マーカー遺伝子および当該分野で公知の他の遺伝的エレメントも含み得る。

## 【0168】

別段説明されない限り、本明細書中で使用されるすべての専門用語および科学用語は、本開示が属する分野の当業者が通常理解する意味と同じ意味を有する。単数形の用語「a」、「an」および「the」は、文脈が明らかに別のことを示していない限り、複数の指示対象を含む。同様に、単語「または」は、文脈が明らかに別のことを示していない限り、「および」を含むと意図される。それゆえ、「AまたはBを含む」は、A、またはB、またはAおよびBを含むを意味する。さらに、核酸またはポリペプチドに対して与えられるすべての塩基サイズまたはアミノ酸サイズおよびすべての分子量または分子質量の値は、近似であり、説明のために提供されるものであると理解される。本明細書中に提供されるものと類似または等価な方法および材料が、本開示の実施または試験において使用され得るが、適当な方法および材料が、以下に記載される。すべての刊行物、特許出願、特許、Genbank Accession番号および本明細書中で述べられる他の参考文献は、その全体が参考として援用される。矛盾する場合は、用語の説明を含む本明細書が、支配する。さらに、材料、方法および実施例は、単なる例示であり、限定を意図しない。

30

40

## 【0169】

III. HMW - MAAに特異的に結合するヒトモノクローナル抗体

HMW - MAAに特異的に結合するヒトモノクローナル抗体およびその機能性フラグメントが、本明細書中に開示される。1つの例において、HMW - MAAは、以下に示されるアミノ酸配列を有する：

## 【0170】

## 【化1】

EQMREEPEAA YRLIQGPQYG HLLVGGRRPTS AFSQFQIDQG EVVFAFTNFS SSHDHFRVLA  
 LARGVNASAV VNVTVRALLH VWAGGPWPQG ATLRLDPTVL DAGELANRTG SVPRFRLLLEG  
 PRHGRVVRVP RARTEPGGSQ LVEQFTQQDL EDGRLGLEVG RPEGRAPGPA GDSLTLLELWA  
 QGVPPAVASL DFATEPYNAA RPYSVALLSV PEAARTEAGK PESSTPTGEP GPMASSPEPA  
 VAKGGFLSFL EANMFSVIIP MCLVLLLLLAL ILPLLFYLRK RNKTGKHDVQ VLTAKPRNGL  
 AGDTETFRKV EPGQAIPLTA VPGQLFP (配列番号14)

本明細書中で参考として援用される G E N B A N K (登録商標) A c c e s s i o n 番号  
 A A I 2 8 1 1 1 も参照のこと。

10

## 【0171】

H M W - M A A は、メラノーマ細胞が内皮基底膜に広がる初期現象中に、細胞と下層との相互作用の安定化において役割を果たすヒトメラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカンである。C S P G 4 は、ヒト悪性メラノーマ細胞によって発現される内在性膜コンドロイチン硫酸プロテオグリカンを意味する。

## 【0172】

H M W - M A A は、C S P G 4 としても知られる。インビボにおいて、H M W - M A A は、非共有結合的に会合された2つのグリコポリペプチドからなる分子として存在する。一方は、280Kという見かけの分子量を有し、他方は、440Kを超える見かけの分子量を有する。H M W - M A A は、ヒトメラノーマ細胞によって合成され、発現される ( S p i r o , R . C . ら、F . B i o l . C h e m . 2 6 4 : 1 7 7 9 ( 1 9 8 9 ) ; E s k o , J . D . , ら、S c i e n c e 2 4 1 : 1 0 9 2 , 1 9 8 8 ) 。プロテオグリカンは、そのコアにおけるセリン残基に共有結合的に付着されたグリコサミノグリカン ( G A G ) 多糖鎖を有する糖タンパク質である。M + H M W - M A A コアタンパク質は、最初、高マンノースタイプのアスパラギンN結合型オリゴ糖を有する、分子質量が240Kの前駆体として翻訳される。

20

## 【0173】

別の例において、H M W - M A A は、以下に示される核酸配列によってコードされる：

## 【0174】

## 【化2】

gggagcagat gagggaggag ccagaggcag cataccgcct catccaggga ccccagtatg  
 ggcatctcct ggtgggcggg cggcccacct cggccttcag ccaattccag atagaccagg  
 gcgaggtggt ctttgcttcc accaacttct cctcctctca tgaccacttc agagtctctg  
 cactggctag ggggtgcaat gcatcagccg tagtgaacgt cactgtgagg gctctgctgc  
 atgtgtgggc aggtgggcca tggccccagg gtgccaccct gcgcctggac cccaccgtcc  
 tagatgctgg cgagctggcc aaccgcacag gcagtggtcc gcgcttcgcg ctctctggagg  
 gaccccggca tggcccgctg gtccgcgtgc cccgagccag gacggagccc gggggcagcc  
 agctggtgga gcagttcact cagcaggacc ttgaggacgg gaggtggggg ctggagggtg  
 gcaggccaga ggggagggcc cccggccccg caggtgacag tctcactctg gagctgtggg  
 cacagggcgt cccgcctgct gtggcctccc tggactttgc cactgagcct tacaatgctg  
 cccggcccta cagcgtggcc ctgctcagtg tccccgaggc cggcccggacg gaagcagggg  
 agccagagag cagcaccccc acaggcgagc caggccccat ggcattccagc cctgagcccg  
 ctgtggccaa gggaggettc ctgagcttcc ttgaggccaa catgttcagc gtoatcatec  
 ccatgtgcct ggtacttctg ctctctgggc tcatcctgcc cctgctcttc taacctcgaa  
 aacgcaaaa gacgggcaag catgacgtcc aggtcctgac tgccaagccc cgcaacggcc  
 tggctggtga caccgagacc ttctgcaagg tggagccagg ccaggccatc ccgctcacag  
 ctgtgcctgg ccagttatatt cca (配列番号15)

30

40

本明細書中で参考として援用される G E N B A N K (登録商標) A c c e s s i o n 番号  
 B C 1 2 8 1 1 0 もまた参照のこと。当業者 ( O n c e o f s k i l l i n t

50

heart) は、分子生物学における標準的な方法を用いて、HMW - MAAなどのポリペプチドを生成する核酸配列を容易に使用し得る(例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989を参照のこと)。

【0175】

ヒトHMW - MAAに特異的に結合する単離されたヒトモノクローナル抗体およびそのフラグメントが、本明細書中に記載される。いくつかの実施形態において、そのヒトモノクローナル抗体の機能性フラグメントは、scFvである。提供されるヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメントおよび薬学的に許容可能なキャリアを含む組成物もまた記載される。これらの抗体をコードする核酸、これらの核酸を含む発現ベクター、およびそれらの核酸を発現する単離された宿主細胞もまた提供される。

10

【0176】

ヒトHMW - MAAに特異的に結合するヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメントを含む免疫結合体もまた本明細書中に記載される。その免疫結合体は、任意の治療用薬剤、トキシンまたは他の部分を含み得る。1つの例において、トキシンは、PEまたはその改変体もしくはフラグメントである。その免疫結合体を含む組成物もまた記載される。

【0177】

HMW - MAAに特異的に結合するヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメントを含む組成物は、スクリーニング、研究、検出および治療的な目的のために使用され得る。例えば、そのヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメントは、競合的イムノアッセイなどにおいて、HMW - MAAに特異的に結合する他の抗体を同定するために使用され得る。

20

【0178】

HMW - MAAに特異的に結合するヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメントを含む組成物は、癌(例えば、正常細胞と比べてHMW - MAAの高発現を示す癌)と診断された被験体を処置するために使用され得る。例えば、その抗体は、メラノーマ、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、結腸癌、胃癌、膵癌、神経膠腫、脊索腫、軟骨肉腫、神経膠腫または扁平上皮癌腫を処置するために使用され得る。メラノーマとしては、拡大型黒色腫、結節性黒色腫、末端部黒子様黒色腫および悪性黒子(メラノーマ)が挙げられる。扁平上皮細胞癌腫としては、頭頸部扁平上皮癌腫、ならびに皮膚、肺、前立腺、食道、膣および子宮頸部の扁平上皮細胞癌が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0179】

HMW - MAA抗体を含む組成物は、転移を予防するため、または微小転移巣(例えば、領域リンパ節への微小転移巣)の数を減少させるためにも使用され得る。HMW - MAA抗体を含む免疫結合体は、癌と診断された患者を処置するためにも使用され得る。そのヒトモノクローナル抗体は、被験体における癌を診断するためにも使用され得る。例えば、そのヒトモノクローナル抗体を、その患者由来のサンプル(例えば、血清サンプル)と接触させることにより、高レベルのHMW - MAAが検出され得る。本明細書中に提供される抗体および組成物は、被験体内の癌を検出するためまたは患者内の癌の診断を確認するためにも使用され得る。

40

【0180】

ヒトHMW - MAAに特異的に結合する完全ヒトモノクローナル抗体およびその機能性フラグメントが、本明細書中に開示される。マウスモノクローナル抗体を臨床で使用するものの主な限界は、その処置を受けた患者におけるヒト抗マウス抗体(HAMA)応答の発生である。HAMA応答は、アレルギー反応および投与された抗体の血清からのクリアランス速度の上昇を伴い得る。様々なタイプの改変モノクローナル抗体が、親モノクローナル抗体の抗原結合親和性を維持するように努めつつ、HAMA応答を最小にするように

50

開発されている。1つのタイプの改変モノクローナル抗体は、マウスの抗原結合可変領域をヒト定常ドメインにつなげたヒト-マウスキメラである (Morrisson and Schlom, Important Advances in Oncology, Rosenberg, S. A. (Ed.), 1989)。第2のタイプの改変モノクローナル抗体は、相補性決定領域 (CDR) が移植された、すなわち、ヒト化されたモノクローナル抗体である (Winter and Harris, Immunol. Today 14: 243-246, 1993)。しかしながら、本明細書中に開示される抗体は、完全ヒト抗体であり; フレームワーク領域と CDR の両方が、ヒト配列に由来する。したがって、これらの抗体がヒト被験体に投与されるとき、HAMA は誘導されない。

#### 【0181】

いくつかの実施形態において、本ヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメントは、配列番号5として示される重鎖アミノ酸配列の少なくとも一部を含み、HMW-MAA に特異的に結合する。いくつかの実施形態において、本ヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメントは、配列番号6として示される軽鎖アミノ酸配列の少なくとも一部を含み、HMW-MAA に特異的に結合する。いくつかの例において、本抗体の重鎖は、配列番号5のアミノ酸27~38 (CDR1)、配列番号5のアミノ酸56~65 (CDR2)、配列番号5のアミノ酸105~115 (CDR3) またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの例において、本抗体の重鎖は、配列番号5のアミノ酸27~38 (CDR1)、配列番号5のアミノ酸56~65 (CDR2) および配列番号5のアミノ酸105~115 (CDR3) を含む。いくつかの例において、本抗体の軽鎖は、配列番号6のアミノ酸27~38 (CDR1)、配列番号6のアミノ酸56~65 (CDR2)、配列番号6のアミノ酸105~110 (CDR3) またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの例において、本抗体の軽鎖は、配列番号6のアミノ酸27~38 (CDR1)、配列番号6のアミノ酸56~65 (CDR2) および配列番号6のアミノ酸105~110 (CDR3) を含む。いくつかの実施形態において、本ヒトモノクローナル抗体は、標識される。いくつかの例において、その標識は、蛍光標識、酵素標識または放射性標識である。

#### 【0182】

本モノクローナル抗体は、任意のアイソタイプであり得る。本モノクローナル抗体は、例えば、IgM または IgG 抗体 (例えば、IgG<sub>1</sub> または IgG<sub>2</sub>) であり得る。HMW-MAA に特異的に結合する抗体のクラスは、別のクラスにスイッチされ得る。1つの態様において、V<sub>L</sub> または V<sub>H</sub> をコードする核酸分子は、それぞれ軽鎖または重鎖の定常領域をコードするいかなる核酸配列も含まないように当該分野で周知の方法を用いて単離される。次いで、V<sub>L</sub> または V<sub>H</sub> をコードする核酸分子は、異なるクラスの免疫グロブリン分子由来の C<sub>L</sub> または C<sub>H</sub> をコードする核酸配列に作動可能に連結される。これは、当該分野で公知であるように、C<sub>L</sub> または C<sub>H</sub> 鎖を含むベクターまたは核酸分子を用いて達成され得る。例えば、当初は IgM だった HMW-MAA に特異的に結合する抗体は、IgG にクラススイッチされ得る。クラススイッチは、1つの IgG サブクラスを別のサブクラスに (例えば、IgG<sub>1</sub> から IgG<sub>2</sub> に) 変換するために用いられ得る。

#### 【0183】

完全ヒトモノクローナル抗体は、ヒトフレームワーク領域を含む。そのヒトフレームワーク領域は、配列番号5または配列番号6の一方または両方に開示されるフレームワーク領域を含み得る (これらの配列は、CDR 配列ならびにフレームワーク配列を含む)。しかしながら、そのフレームワーク領域は、別の起源に由来し得る。使用され得るフレームワーク配列のさらなる例としては、本明細書中で参考として援用される PCT 公開番号 WO 2006/074071 (例えば、配列番号1~16を参照のこと) に開示されている重鎖および軽鎖のアミノ酸フレームワーク配列が挙げられる。

#### 【0184】

抗体フラグメントは、本開示 (例えば、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、Fab、F(ab')<sub>2</sub> および Fv) に包含され、HMW-MAA 上のエピトープ決定基に結

10

20

30

40

50

合することができるものである。これらの抗体フラグメントは、その抗原に特異的に結合する能力を保持する。これらのフラグメントとしては、以下が挙げられる：

(1) 抗体分子の一価の抗原結合フラグメントを含むフラグメントである Fab は、酵素パパインで抗体全体を消化することによって生成されることにより、インタクトな軽鎖および1つの重鎖の部分を生じ得る；

(2) 抗体分子のフラグメントである Fab' は、抗体全体をペプシンで処理した後、還元することにより得られ、これによりインタクトな軽鎖および重鎖の一部がもたらされ得る；抗体1分子あたり2つの Fab' フラグメントが得られる；

(3) 抗体全体を酵素ペプシンで処理すること（その後の還元は行わない）によって得られ得る抗体のフラグメントである (Fab')<sub>2</sub>；F(ab')<sub>2</sub> は、2つのジスルフィド結合によってともに保持されている2つの Fab' フラグメントの二量体である；

(4) 2本の鎖として発現される軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含む遺伝的に操作されたフラグメントである Fv；および

(5) 遺伝的に融合された一本鎖分子として、適当なポリペプチドリinkerによって連結された軽鎖の可変領域、重鎖の可変領域を含む遺伝的に操作された分子と定義される、一本鎖抗体（例えば、scFv）

(6) scFvの二量体と定義される、一本鎖抗体の二量体 (scFv)<sub>2</sub>。これは、「ミニ抗体 (miniantibody)」とも呼ばれている。

#### 【0185】

これらのフラグメントを生成する方法は、当該分野で公知である（例えば、Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988を参照のこと）。いくつかの例において、本抗体に含められる可変領域は、M912の可変領域である。

#### 【0186】

さらなる群の実施形態において、本抗体は、代表的には約25kDaであり、各重鎖および各軽鎖あたり3つのCDRを有する完全な抗原結合部位を含むFv抗体である。これらの抗体を生成するために、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>を、宿主細胞内の2つの個別の核酸構築物から発現させ得る。そのV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>が、隣接せずに発現される場合、Fv抗体の鎖は、代表的には、非共有結合性相互作用によって共に保持される。しかしながら、これらの鎖は、希釈されると解離する傾向があるので、それらの鎖をグルタルアルデヒド、分子間ジスルフィドまたはペプチドリinkerによって架橋する方法が開発された。したがって、1つの例において、Fvは、その重鎖可変領域および軽鎖可変領域がジスルフィド結合によって化学的に連結されている、ジスルフィド安定化Fv (dsFv) であり得る。

#### 【0187】

さらなる例において、Fvフラグメントは、ペプチドリinkerによって接続されたV<sub>H</sub>鎖およびV<sub>L</sub>鎖を含む。これらの一本鎖抗原結合タンパク質 (scFv) は、オリゴヌクレオチドによって接続された、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインをコードするDNA配列を含む構造遺伝子を構築することによって調製される。その構造遺伝子は、発現ベクターに挿入され、続いてそれは大腸菌などの宿主細胞に導入される。その組換え宿主細胞は、2つのVドメインを架橋するリンカーペプチドを有する単一のポリペプチド鎖を合成する。scFvを生成するための方法は、当該分野で公知である (Whitlowら、*Methods: a Companion to Methods in Enzymology*, Vol. 2, 97頁, 1991; Birdら、*Science* 242: 423, 1988; 米国特許第4,946,778号; Packら、*Bio/Technology* 11: 1271, 1993; およびSandhu, 前出を参照のこと)。一本鎖抗体の二量体 (scFv)<sub>2</sub> もまた企図される。

#### 【0188】

抗体フラグメントは、抗体のタンパク分解性加水分解またはそのフラグメントをコードするDNAの大腸菌における発現によって調製され得る。抗体フラグメントは、従来の方

10

20

30

40

50

法による抗体全体のペプシンまたはパイン消化によって得られ得る。例えば、抗体フラグメントは、ペプシンを用いた抗体の酵素的切断によって生成されることにより、 $F(ab')_2$ と表示される5Sフラグメントがもたらされ得る。このフラグメントは、チオール還元剤、および必要に応じて、ジスルフィド結合の切断に起因するスルフィドリル基に対する保護基を用いて、さらに切断されることにより、3.5S Fab'一価フラグメントをもたらし得る。あるいは、ペプシンを用いた酵素的切断は、2つの一価Fab'フラグメントおよびFcフラグメントを直接生成する(米国特許第4,036,945号および米国特許第4,331,647号、ならびにそれらに含まれる参考文献; Nisonhoffら、Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960; Porter, Biochem. J. 73:119, 1959; Edelmanら、Methods in Enzymology, Vol. 1, 422頁, Academic Press, 1967; および Coliganら、2.8.1-2.8.10および2.10.1-2.10.4項を参照のこと)。

10

## 【0189】

フラグメントが、インタクトな抗体によって認識される抗原に結合する限り、抗体を切断する他の方法(例えば、一価の軽鎖-重鎖フラグメントを形成する重鎖の分離、フラグメントのさらなる切断、または他の酵素的、化学的もしくは遺伝的手法)も使用してもよい。

## 【0190】

当業者は、抗体の保存的改変体が生成され得ることを認識する。dsFvフラグメントなどの抗体フラグメントまたはscFvフラグメントとして使用されるそのような保存的改変体は、適切なフォールディングおよび $V_H$ 領域と $V_L$ 領域との間の安定化のために必要な重要なアミノ酸残基を保持し、その分子の低pIおよび低毒性を保つためにそれらの残基の電荷特性を保持する。アミノ酸置換(例えば、多くとも1つ、多くとも2つ、多くとも3つ、多くとも4つまたは多くとも5つのアミノ酸置換)が $V_H$ 領域および $V_L$ 領域において生成されることにより、収量が増加し得る。機能的に類似するアミノ酸を提供する保存的アミノ酸置換の表は、当業者に周知である。以下の6つの群が、互いに保存的置換であると考えられるアミノ酸の例である:

20

- 1) アラニン(A)、セリン(S)、トレオニン(T);
- 2) アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E);
- 3) アスパラギン(N)、グルタミン(Q);
- 4) アルギニン(R)、リジン(K);
- 5) イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V); および
- 6) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)。

30

## 【0191】

IV. 治療部分および診断部分として使用するための免疫結合体

ヒトHMW-MAAに特異的に結合するヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメントは、治療方法において使用され得る。いくつかの実施形態において、本明細書中に記載されるヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメントは、治療用薬剤に結合体化され得る。免疫結合体としては、治療用薬剤が抗体に共有結合されている分子が挙げられるが、これに限定されない。治療用薬剤は、特定の標的分子または標的分子を有する細胞に対して向けられている特定の生物学的活性を有する薬剤である。当業者は、治療用薬剤が、ピンブラスチン、ダウノマイシンなどの様々な薬物、天然のまたは改変されたPseudomonas外毒素またはジフテリア毒素などの細胞毒、それ自体が薬理学的組成物を含む封入剤(例えば、リポソーム)、放射性物質(例えば、 $^{125}I$ 、 $^{32}P$ 、 $^{14}C$ 、 $^3H$ および $^{35}S$ )ならびに他の標識、標的化部分およびリガンドを含み得ることを認識する。

40

## 【0192】

特定の治療用薬剤の選択は、特定の標的分子または標的細胞および所望の生物学的作用に左右される。したがって、例えば、治療用薬剤は、特定の標的細胞の死をもたらすため

50

に使用される細胞毒であり得る。逆に、非致死性の生物学的応答の誘導が望まれる場合、治療用薬剤は、非致死性の薬理学的物質または非致死性の薬理学的物質を含むリボソームに結合体化され得る。

【0193】

当業者は、本明細書中に記載される治療用薬剤および抗体を用いて、機能的に等価な核酸（例えば、配列は異なるが、同じEMまたは抗体配列をコードする核酸）を含む種々のクローンを容易に構築し得る。したがって、本発明は、抗体をコードする核酸、ならびにその結合体および融合タンパク質を提供する。

【0194】

エフェクター分子は、当業者に公知の任意の数の手段を用いて目的の抗体に連結され得る。共有結合性と非共有結合性の結合手段の両方が、使用され得る。エフェクター分子を抗体に付着するための手順は、エフェクターの化学構造によって異なる。ポリペプチドは、代表的には、種々の官能基；例えば、カルボン酸（COOH）、遊離アミン（-NH<sub>2</sub>）またはスルフヒドリル（-SH）基を含み、これらは、抗体上の適当な官能基との反応に利用可能であることにより、エフェクター分子の結合をもたらす。あるいは、抗体は、誘導體化されることにより、露出されるか、またはさらなる反応性官能基を付着される。誘導體化は、いくつかのリンカー分子（例えば、Pierce Chemical Company, Rockford, ILから入手可能なもの）のいずれかの付着を含み得る。リンカーは、抗体をエフェクター分子に接着するために使用される任意の分子であり得る。リンカーは、抗体とエフェクター分子の両方に対して共有結合を形成することができる。適当なリンカーは、当業者に周知であり、それらとしては、直鎖または分枝鎖の炭素リンカー、複素環式炭素リンカーまたはペプチドリリンカーが挙げられるが、これらに限定されない。抗体およびエフェクター分子が、ポリペプチドである場合、リンカーは、側基（例えば、システインに対するジスルフィド結合）または末端アミノ酸のアルファ炭素アミノ基およびアルファカルボキシル基を介して構成アミノ酸に接着され得る。

10

20

【0195】

いくつかの状況において、免疫結合体はその標的部位に到達したときには、エフェクター分子を抗体から放すことが望ましい。ゆえに、これらの状況において、免疫結合体は、標的部位付近で切断可能な結合を含む。リンカーを切断することによりエフェクター分子を抗体から放出することは、標的細胞内または標的部位付近で免疫結合体が曝される酵素活性または酵素条件によって促され得る。

30

【0196】

種々の放射性診断化合物、放射性治療化合物、標識（例えば、酵素または蛍光分子）薬物、トキシンおよび他の薬剤を抗体に付着するために報告されている多数の方法に鑑みて、当業者は、所与の薬剤を抗体または他のポリペプチドに付着するための適当な方法を判断することができる。

【0197】

本明細書中に開示されるHMW-MAAに特異的に結合する抗体または抗体フラグメントは、誘導體化され得るか、または別の分子（例えば、別のペプチドまたはタンパク質）に連結され得る。一般に、それらの抗体またはその一部は、HMW-MAAへの結合が誘導體化または標識によって悪影響を受けないように誘導體化される。例えば、それらの抗体は、1つ以上の他の分子実体（例えば、別の抗体（例えば、二重特異性抗体またはダイアボディ）、検出剤、医薬品、および/またはその抗体もしくは抗体部分と別の分子（例えば、ストレプトアビジンコア領域またはポリヒスチジンタグ）との会合を媒介し得るタンパク質もしくはペプチド）に機能的に連結され得る（化学的結合、遺伝的融合、非共有結合性会合またはその他の方法によって）。

40

【0198】

1つのタイプの誘導體化抗体は、2つ以上の抗体（二重特異性抗体を作製するなどのために、同じタイプまたは異なるタイプの抗体）を架橋することによって生成される。適当な架橋剤としては、適切なスペーサーによって分断された2つの明確に反応性の基を有す

50

るヘテロ二官能性である架橋剤（例えば、*m*-マレイミドベンゾイル-*N*-ヒドロキシスクシンイミドエステル）またはホモ二官能性である架橋剤（例えば、ジスクシンイミジルスベレート）が挙げられる。そのようなリンカーは、Pierce Chemical Company, Rockford, Illから入手可能である。

#### 【0199】

HMW-MAAに特異的に結合するヒト抗体またはその機能性フラグメントは、検出可能な部分で標識され得る。有用な検出剤としては、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、5-ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホニル(naphthalenesulfonyl)クロリド、フィコエリトリン、ランタニドリン光体などを含む蛍光化合物が挙げられる。生物発光マーカー（例えば、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、黄色蛍光タンパク質(YFP)）もまた有用である。抗体は、検出に有用な酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼなど）でも標識され得る。抗体が、検出可能な酵素で標識されるとき、その抗体は、識別され得る反応産物を生成するためにその酵素が使用するさらなる試薬を加えることによって検出され得る。例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ薬剤が、存在するとき、過酸化水素およびジアミノベンジンを加えることにより、視覚的に検出可能な着色された反応産物がもたらされる。抗体は、ピオチンでも標識され得、アビジンまたはストレプトアビジンの結合を間接的に測定することによって検出され得る。アビジン自体が、酵素または蛍光標識で標識され得ることに注意されるべきである。

10

20

#### 【0200】

抗体は、ガドリニウムなどの磁性物質で標識され得る。抗体は、ランタニド（例えば、ユウロピウムおよびジスプロシウム）およびマンガンでも標識され得る。超常磁性酸化鉄などの常磁性粒子もまた、標識として有用であり得る。抗体は、二次レポーター（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体に対する結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）によって認識される所定のポリペプチドエピトープでも標識され得る。いくつかの実施形態において、標識は、潜在的な立体障害を減少させるために様々な長さのスペーサーアームに付着される。

#### 【0201】

抗体は、放射標識されたアミノ酸でも標識され得る。その放射標識は、診断目的と治療目的の両方のために使用され得る。例えば、放射標識は、 $x$ 線、発光スペクトル、磁気共鳴画像法(MRI)、コンピュータ(commuted)断層撮影(CT)スキャン、ポジトロン放出断層撮影法(PET)または他の診断手法によってHMW-MAAを検出するために使用され得る。ポリペプチドに対する標識の例としては、以下の放射性同位体または放射性ヌクレオチド： $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{19}\text{F}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ および $^{125}\text{I}$ が挙げられるが、これらに限定されない。

30

#### 【0202】

抗体はまた、化学基（例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、メチル基もしくはエチル基または炭水化物基）を用いて誘導体化され得る。これらの基は、その抗体の生物学的特性を改善するため（例えば、血清半減期を延長するためまたは組織結合性を高めるため）に有用であり得る。

40

#### 【0203】

トキシンを、本明細書中に記載されるHMW-MAA特異的ヒトモノクローナル抗体およびその機能性フラグメントとともに使用することにより、免疫毒素が生成され得る。例示的なトキシンとしては、リシン、アプリン、ジフテリア毒素およびそのサブユニットならびにボツリヌス毒素A~Fが挙げられる。これらのトキシンは、商業的供給源（例えば、Sigma Chemical Company, St. Louis, MO）から容易に入手可能である。企図されるトキシンは、本明細書中に記載されるトキシンの改変体も含む（例えば、米国特許第5,079,163号および同第4,689,401号を参照

50

のこと)。1つの実施形態において、トキシンは、*Pseudomonas* 外毒素 (PE) である (米国特許第 5,602,095 号)。本明細書中で使用される場合、「*Pseudomonas* 外毒素」とは、完全長の天然 (天然に存在する) PE または改変された PE のことを指す。そのような改変物としては、ドメイン Ia の除去、ドメイン Ib、I I および I I I における様々なアミノ酸欠失、単一アミノ酸置換、ならびにカルボキシル末端における 1 つ以上の配列の付加が挙げられ得るが、これらに限定されない (例えば、Siegalら、*J. Biol. Chem.* 264:14256-14261, 1989 を参照のこと)。1つの実施形態において、PE の細胞傷害性フラグメントは、天然 PE の細胞傷害性の少なくとも 50%、少なくとも 75%、少なくとも 90% または少なくとも (at least) 95% を保持する。いくつかの例において、その細胞傷害性フラグメントは、天然の PE よりも有毒である。

10

#### 【0204】

天然の *Pseudomonas* 外毒素 A (PE) は、*Pseudomonas aeruginosa* によって分泌される、真核細胞においてタンパク質合成を阻害する極度に活性な単量体タンパク質である (分子量 66 kD)。PE の作用方法は、伸長因子 2 (EF-2) の ADP リボシル化の不活性化である。この外毒素は、協調することにより細胞傷害性を引き起こす 3 つの構造ドメインを含む。ドメイン Ia は、細胞結合を媒介する。ドメイン I I は、サイトゾルへの転位に関与し、ドメイン I I I は、伸長因子 2 の ADP リボシル化を媒介する。ドメイン Ib の機能は、不明である。本明細書中に記載されるモノクローナル抗体とともに使用される PE は、天然の配列、天然の配列の細胞傷害性フラグメントならびに天然の PE およびその細胞傷害性フラグメントの保存的に改変された改変体を含み得る。PE の細胞傷害性フラグメントは、標的細胞におけるその後のタンパク質分解性プロセッシングまたは他のプロセッシングによってまたはよらずに細胞傷害性であるフラグメントを含む。PE の細胞傷害性フラグメントとしては、PE 40、PE 38 および PE 35 が挙げられる。PE およびその改変体のさらなる説明については、例えば、米国特許第 4,892,827 号; 同第 5,512,658 号; 同第 5,602,095 号; 同第 5,608,039 号; 同第 5,821,238 号; および同第 5,854,044 号; PCT 公開番号 WO 99/51643; Paiら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3358-3362, 1991; Kondora、*J. Biol. Chem.* 263:9470-9475, 1988; Pastanら、*Biochim. Biophys. Acta* 1333:C1-C6, 1997 (これらの各々は本明細書中で参考として援用される) を参照のこと。

20

30

#### 【0205】

本明細書中に記載される抗体およびその機能性フラグメントは、任意の数の様々な診断用化合物または治療用化合物を、その表面上で HMW-MAA を発現する細胞に対して標的化するためにも使用され得る。したがって、本開示の抗体は、直接またはリンカーを介して、細胞表面 HMW-MAA を発現する細胞に直接送達される薬物に付着され得る。治療用物質は、核酸、タンパク質、ペプチド、アミノ酸または誘導体、糖タンパク質、放射性同位体、脂質、炭水化物または組換えウイルスのような化合物を含む。核酸の治療部分および診断部分は、アンチセンス核酸、一本鎖または二重鎖 DNA との共有結合性架橋のための誘導体化オリゴヌクレオチド、および三重鎖形成オリゴヌクレオチドを含む。

40

#### 【0206】

あるいは、抗 HMW-MAA 抗体に連結される分子は、治療用組成物 (例えば、薬物、核酸 (例えば、アンチセンス核酸) または好ましくは循環器系に対する直接的な曝露から遮蔽される別の治療的部分) を含むリボソームまたはミセルなどの被包系であり得る。抗体に付着されたりリボソームを調製する手段は、当業者に周知である (例えば、米国特許第 4,957,735 号; Connorら、*Pharm. Ther.* 28:341-365, 1985 を参照のこと)。

#### 【0207】

本明細書中に記載される抗体はまた、検出可能な標識に、共有結合的にまたは非共有結

50

合的に連結され得る。そのような用途に適した検出可能な標識としては、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的な手段によって検出可能な任意の組成物が挙げられる。有用な標識としては、磁気ビーズ、蛍光色素（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質など）、放射標識（例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、または $^{32}\text{P}$ ）、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼおよびELISAで通常使用されるその他のもの）および比色標識（例えば、コロイド金、または着色ガラスビーズもしくは着色プラスチックビーズ（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど））が挙げられる。これらの抗体は、蛍光励起細胞分取（FACS）、免疫組織化学、放射免疫アッセイ（RIAs）および酵素結合免疫吸着測定法（enzyme-linked immunosorbent assays）（ELISA）をはじめとした種々のイムノアッセイにおいて使用され得る。

#### 【0208】

そのような標識を検出する手段は、当業者に周知である。したがって、例えば、放射標識は、写真フィルムまたはシンチレーションカウンターを用いて検出され得、蛍光マーカは、放射された照射を検出する光検出器を用いて検出され得る。酵素標識は、代表的には、その酵素に基質を提供し、その基質に対する酵素の作用によって生成された反応産物を検出することによって検出され、比色標識は、単に着色された標識を可視化することによって検出される。

#### 【0209】

V<sub>H</sub>・HMW-MAA抗体ポリヌクレオチドおよびポリペプチド

本明細書中に提供されるポリペプチド（抗体、その機能性フラグメント、免疫結合体および融合タンパク質を含むがこれらに限定されない）をコードする核酸分子（ポリヌクレオチドとも呼ばれる）は、本明細書中に提供されるアミノ酸配列、当該分野において入手可能な配列および遺伝暗号を用いて、当業者によって容易に生成され得る。さらに、当業者は、機能的に等価な核酸（例えば、配列は異なるが、同じエフェクター分子配列または抗体配列をコードする核酸）を含む種々のクローンを容易に構築し得る。したがって、抗体、結合体および融合タンパク質をコードする核酸が、本明細書中に提供される。

#### 【0210】

いくつかの実施形態において、HMW-MAAヒトモノクローナル抗体は、配列番号1を含むヌクレオチド配列によってコードされるV<sub>H</sub>ドメインを有する。いくつかの実施形態において、HMW-MAAヒトモノクローナル抗体は、配列番号3を含むヌクレオチド配列によってコードされるV<sub>L</sub>ドメインを有する。いくつかの実施形態において、HMW-MAAヒトモノクローナル抗体は、配列番号4のヌクレオチド配列を含む重鎖を有する。

#### 【0211】

HMW-MAAに特異的に結合するヒト抗体またはHMW-MAAに特異的に結合するその機能性フラグメントをコードする核酸配列は、例えば、適切な配列のクローニングを含む任意の適当な方法、またはNarangら、Meth. Enzymol. 68:90-99, 1979のホストリエステル法；Brownら、Meth. Enzymol. 68:109-151, 1979のホスホジエステル法；Beaucageら、Tetra. Lett. 22:1859-1862, 1981のジエチルホスホルアミダイト法；例えば、Needham-VanDevanterら、Nucl. Acids Res. 12:6159-6168, 1984に記載されているような例えば自動合成装置を用いる、Beaucage & Caruthers, Tetra. Letts. 22(20):1859-1862, 1981によって記載されている固相ホスホルアミダイトリエステル法；および米国特許第4,458,066号の固体支持体法などの方法による直接的な化学合成によって調製され得る。化学合成は、一本鎖オリゴヌクレオチドを生成する。これは、鋳型としてその一本鎖を用いる、相補的な配列とのハイブリダイゼーションまたはDNAポリメラーゼによる重合によって、二本鎖DNAに変換され得る。当業者は

10

20

30

40

50

、DNAの化学合成が、一般に、約100塩基の配列に制限されるが、それよりも長い配列がより短い配列のライゲーションによって得られ得ることを認識するだろう。

【0212】

HMW-MAAに特異的に結合するヒト抗体またはHMW-MAAに特異的に結合するその機能性フラグメントをコードする例示的な核酸は、クローニング手法によって調製され得る。適切なクローニング手法および配列決定手法の例ならびに多くのクローニング演習を通じて当業者を指示するのに十分な指示書は、Sambrookら、前出、Berger and Kimmel (eds.)、前出およびAusubel、前出に見られる。生物学的試薬および実験機器の製造者からの製品情報も、有用な情報を提供する。そのような製造者としては、SIGMA Chemical Company (Saint Louis, MO)、R&D Systems (Minneapolis, MN)、Pharmacia Amersham (Piscataway, NJ)、CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA)、Chem Genes Corp.、Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI)、Glen Research, Inc.、GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD)、Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)、Invitrogen (Carlsbad, CA)およびApplied Biosystems (Foster City, CA)ならびに当業者に公知の他の多くの商業的供給源が挙げられる。

10

20

【0213】

天然のエフェクター分子(EM)または抗HMW-MAA抗体をコードする核酸は、本開示のEM、抗体または免疫結合体を形成するように改変され得る。部位特異的突然変異誘発による改変は、当該分野で周知である。核酸は、増幅方法によっても調製され得る。増幅方法としては、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、転写ベース増幅系(TAS)、自己持続性配列複製系(self-sustained sequence replication system)(SSR)が挙げられる。多種多様のクローニング方法、宿主細胞およびインビトロ増幅方法が、当業者に周知である。

【0214】

1つの実施形態において、免疫結合体は、ヒトHMW-MAA特異的モノクローナル抗体またはその機能性フラグメントをコードするcDNAを、EMをコードするcDNAを含むベクターに挿入することによって調製される。この挿入は、その抗体とEMとが、機能的抗体領域および機能的EM領域を含む1つの連続したポリペプチドとしてインフレームで読まれるように、行われる。1つの実施形態において、EM、標識または酵素をコードするcDNAは、EM、標識または酵素がその抗体のカルボキシル末端に位置するように抗体にライゲーションされる。別の実施形態において、EM、標識または酵素は、抗体のアミノ末端に位置する。別の例において、EM、標識または酵素をコードするcDNAは、EM、標識または酵素が重鎖可変領域のカルボキシル末端に位置するように、抗体の重鎖可変領域にライゲーションされる。続いて、その重鎖可変領域は、ジスルフィド結合を用いてその抗体の軽鎖可変領域にライゲーションされ得る。なおも別の例において、EM、標識または酵素をコードするcDNAは、EM、標識または酵素が軽鎖可変領域のカルボキシル末端に位置するように、抗体の軽鎖可変領域にライゲーションされる。続いて、その軽鎖可変領域は、ジスルフィド結合を用いてその抗体の重鎖可変領域にライゲーションされ得る。

30

40

【0215】

いったん、EM、抗HMW-MAA抗体、その機能性フラグメントまたは免疫結合体をコードする核酸が、単離されてクローニングされると、所望のタンパク質が、組換え的に操作された細胞(例えば、細菌、植物、酵母、昆虫および哺乳動物の細胞)において発現され得る。当業者は、大腸菌、他の細菌宿主、酵母および様々な高等真核細胞(例えば、

50

COS、CHO、HeLaおよびミエローマ細胞株)を含むタンパク質の発現に利用可能な多くの発現系に精通していると予想される。

【0216】

本抗体またはそのフラグメントをコードする1つ以上のDNA配列は、DNAを適当な宿主細胞に移入することによってインビトロにおいて発現され得る。その細胞は、原核生物または真核生物の細胞であり得る。この用語は、対象宿主細胞の任意の子孫も含む。複製中に生じる変異が存在し得るので、すべての子孫が、親細胞と同一でないかもしれないことが理解される。外来DNAが宿主内に継続的に維持されることを意味する安定な移入の方法は、当該分野で公知である。目的の抗体を発現するハイブリドーマもまた、本開示によって包含される。

10

【0217】

本明細書中に記載される単離された抗体および抗体フラグメントをコードする核酸の発現は、DNAまたはcDNAをプロモーター(構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターのいずれか)に作動可能に連結した後、発現カセットに組み込むことによって達成され得る。そのカセットは、原核生物または真核生物のいずれかにおける複製および組み込みに適し得る。代表的な発現カセットは、タンパク質をコードするDNAの発現の制御に有用な特異的配列を含む。例えば、発現カセットは、適切なプロモーター、エンハンサー、転写ターミネーターおよび翻訳ターミネーター、開始配列、タンパク質をコードする遺伝子の前に存在する開始コドン(すなわち、ATG)、イントロンに対するスプライシングシグナル、すなわち、mRNAの適切な翻訳を可能にするその遺伝子の適切な読み枠の維持のためのスプライシングシグナル、ならびに終止コドンを含み得る。

20

【0218】

クローニングされた遺伝子の高レベルの発現を得るために、少なくとも、転写を指示する強力なプロモーター、翻訳開始のためのリボソーム結合部位および転写/翻訳ターミネーターを含む発現カセットを構築することが望ましい。大腸菌に対しては、これは、プロモーター(例えば、T7、trp、lacまたはラムダプロモーター)、リボソーム結合部位および好ましくは転写終結シグナルを含む。真核細胞に対しては、調節配列は、例えば、免疫グロブリン遺伝子、SV40またはサイトメガロウイルスに由来するプロモーターおよび/またはエンハンサーならびにポリアデニル化配列を含み得、スプライスドナー配列およびスプライサクセプター配列をさらに含み得る。そのカセットは、周知の方法(例えば、大腸菌に対しては形質転換またはエレクトロポレーション、および哺乳動物細胞に対してはリン酸カルシウム処理、エレクトロポレーションまたはリポフェクション)によって、選択された宿主細胞に移入され得る。カセットによって形質転換された細胞は、そのカセットに含まれる遺伝子(例えば、amp、gpt、neoおよびhyg遺伝子)によって付与された抗生物質に対する耐性によって選択され得る。

30

【0219】

宿主が真核生物であるとき、リン酸カルシウム共沈殿、従来の力学的手順(例えば、リボソームに包まれたプラスミドまたはウイルスベクターのマイクロインジェクション、エレクトロポレーション、挿入)のようなDNAのトランスフェクション方法が、使用され得る。真核細胞はまた、抗体、標識された抗体またはそれらの機能性フラグメントをコードするポリヌクレオチド配列、および単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子などの選択可能な表現型をコードする第2の外來DNA分子と同時形質転換され得る。別の方法は、真核生物ウイルスベクター(例えば、サルウイルス40(SV40)またはウシバビローマウイルス)を使用して、真核細胞を一過性に感染させるかまたは形質転換し、そのタンパク質を発現させることである(例えば、Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982を参照のこと)。当業者は、高等真核細胞(例えば、COS、CHO、HeLaおよびミエローマ細胞株)を含む細胞においてタンパク質を生成する際に有用なプラスミドおよびベクターなどの発現系を容易に使用し得る。

40

【0220】

50

改変は、本明細書中に記載されるポリペプチド（すなわち、ヒトH M W - M A A 特異的モノクローナル抗体またはその抗体を含む免疫結合体）をコードする核酸に対して、その生物学的活性を低下させずに、行われ得る。いくつかの改変は、標的化分子のクローニング、発現または融合タンパク質への組み込みを容易にするために行われ得る。そのような改変物は、当業者に周知であり、それらは、例えば、終止コドン、開始部位を提供するためにアミノ末端に付加されたメチオニン、都合のよい位置に制限酵素認識部位を設けるためにいずれかの末端に位置する追加のアミノ酸、または精製工程に役立つ追加のアミノ酸（例えば、ポリHis）を含む。組換え方法に加えて、本開示の免疫結合体、エフェクター部分および抗体はまた、当該分野で周知の標準的なペプチド合成を用いて、全体として、または部分的に構築され得る。

10

## 【0221】

組換え免疫結合体、抗体および/またはエフェクター分子は、いったん発現されると、硫酸塩析、アフィニティークラム、カラムクロマトグラフィなどを含む当該分野の標準的な手順に従って精製され得る（一般には、R. S c o p e s , P R O T E I N P U R I F I C A T I O N , S p r i n g e r - V e r l a g , N . Y . , 1 9 8 2 を参照のこと）。それらの抗体、免疫結合体およびエフェクター分子は、100%純粋である必要はない。そのポリペプチドは、いったん精製されると、治療的に使用される場合は望まれるように部分的にまたは均質に、エンドトキシンを実質的に含まないべきである。

## 【0222】

大腸菌などの細菌からの、一本鎖抗体の発現および/または一本鎖抗体を含む適切な活性型へのリフォールディングのための方法は、すでに報告されており、周知であり、本明細書中に開示される抗体に対して適用可能である。B u c h n e r ら、A n a l . B i o c h e m . 2 0 5 : 2 6 3 - 2 7 0 , 1 9 9 2 ; P l u c k t h u n , B i o t e c h n o l o g y 9 : 5 4 5 , 1 9 9 1 ; H u s e ら、S c i e n c e 2 4 6 : 1 2 7 5 , 1 9 8 9 およびW a r d ら、N a t u r e 3 4 1 : 5 4 4 , 1 9 8 9（すべてが本明細書中で参考として援用される）を参照のこと。

20

## 【0223】

しばしば、大腸菌または他の細菌由来の機能的異種タンパク質が、封入体から単離され、それは、強力な変性剤を用いた可溶化およびその後のリフォールディングを必要とする。当該分野で周知であるように、ジスルフィド結合を分離するために、還元剤を可溶化工程中に含まれなければならない。還元剤を含む例示的な緩衝液は：0.1 M T r i s p H 8、6 M グアニジン、2 m M E D T A、0.3 M D T E（ジチオエリトリール）である。ジスルフィド結合の再酸化は、S a x e n a ら、B i o c h e m i s t r y 9 : 5 0 1 5 - 5 0 2 1 , 1 9 7 0（本明細書中で参考として援用される）および特に、B u c h n e r ら、前出に記載されているように、還元型および酸化型の低分子量チオール試薬の存在下において生じ得る。

30

## 【0224】

再生は、代表的には、変性されたタンパク質および還元されたタンパク質のリフォールディング緩衝液への希釈（例えば、100倍）によって達成される。例示的な緩衝液は、0.1 M T r i s , p H 8 . 0、0.5 M L - アルギニン、8 m M 酸化型グルタチオン（G S S G）および2 m M E D T Aである。

40

## 【0225】

2本鎖抗体の精製プロトコルの変法として、重鎖領域および軽鎖領域を別々に可溶化し、還元し、次いで、リフォールディング溶液中で併せる。これらの2つのタンパク質を、一方のタンパク質が他方に対して5倍過剰なモル濃度を超えないようなモル比で混合すると、例示的な収量が得られる。酸化還元シャフリング（redox-shuffling）が完了した後、過剰な酸化型グルタチオンまたは他の低分子量酸化化合物が、リフォールディング溶液に加えられ得る。

## 【0226】

組換え方法に加えて、本明細書中に開示される抗体、標識された抗体およびそれらの機

50

能性フラグメントはまた、標準的なペプチド合成を用いて、全体として、または部分的に構築され得る。約50アミノ酸長未満のポリペプチドの固相合成は、その配列のC末端アミノ酸を不溶性支持体に付着した後、その配列の残りのアミノ酸を順番に付加することによって達成され得る。固相合成についての手法は、Barany & Merrifield, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. Vol. 2: *Special Methods in Peptide Synthesis*, Part A. pp. 3 - 284; Merrifieldら、*J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149 - 2156, 1963およびStewartら、*Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed., Pierce Chem. Co., Rockford, Ill., 1984に記載されている。より長いタンパク質は、より短いフラグメントのアミノ末端とカルボキシル末端との縮合によって合成され得る。カルボキシル末端の活性化によってペプチド結合を形成する方法(例えば、カップリング試薬N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(dicyclohexylcarbodiimide)を使用することによる方法)は、当該分野で周知である。

10

20

30

40

50

#### 【0227】

##### VI. 組成物および治療方法

キャリア、およびHMW-MAAに特異的に結合する抗体またはHMW-MAAに特異的に結合するその機能性フラグメントの1つ以上を含む組成物が、本明細書中に提供される。免疫結合体または免疫毒素を含む組成物もまた、提供される。その組成物は、被験体に投与するための単位剤形で調製され得る。所望の目的を達成するために、投与の量およびタイミングは、処置する医師の判断による。その抗体は、全身投与または局所(例えば、腫瘍内)投与のために製剤化され得る。1つの例において、HMW-MAAに特異的に結合する抗体は、静脈内投与などの非経口投与のために製剤化される。

#### 【0228】

投与用の組成物は、水溶性キャリアなどの薬学的に許容可能なキャリアに溶解された、HMW-MAAに特異的に結合する抗体(またはその機能性フラグメント)の溶液を含み得る。種々の水溶性キャリア、例えば、緩衝食塩水などが、使用され得る。これらの溶液は、滅菌され、一般に、望ましくない物質を含まない。これらの組成物は、従来の周知の滅菌法によって滅菌され得る。その組成物は、生理学的条件に近づくことが必要とされるとき、薬学的に許容可能な補助剤物質、例えば、pH調整剤およびpH緩衝剤、毒性調整剤など、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどを含み得る。これらの製剤中の抗体の濃度は、広く変動し得、主に、選択される特定の投与様式および被験体のニーズに従って、液量、粘性、体重などに基づいて選択される。

#### 【0229】

静脈内投与用の代表的な薬学的組成物は、約0.1~10mgの抗体/被験体/日を含む。特に、その薬剤が、隔離された部位に投与される場合および循環系またはリンパ系(例えば、体腔または器官の内腔)に投与されない場合、0.1~約100mg/被験体/日の投薬量が使用され得る。投与可能な組成物を調製するための実際の方法は、当業者に公知であるか、または当業者に明らかであり、Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1995)のような刊行物に詳細に記載されている。

#### 【0230】

抗体は、凍結乾燥された形態で提供され得、投与前に滅菌水で再水和され得るが、それらは、既知濃度の滅菌された溶液の形態でも提供される。次いで、その抗体溶液は、0.9%塩化ナトリウム、USPを含む輸液バッグに加えられ、代表的には、0.5~15mg/kg体重の投薬量で投与される。1997年のRITUXAN(登録商標)の承認以来、米国において販売されている抗体薬物の投与の分野における多数の経験内容が利用可

能である。抗体は、静脈内ブッシュまたはポーラスではなく緩徐な注入によって投与され得る。1つの例において、より多い負荷投与量が投与され、その後、維持用量が、より低レベルで投与される。例えば、4 mg / kg という最初の負荷投与量が、何回かの90分間にわたって注入された後、その前の用量に良好な耐容性を示す場合、2 mg / kg の維持用量が、4 ~ 8 週間にわたって毎週、30分間注入され得る。

#### 【0231】

HMW - MAA に特異的に結合する抗体（またはその機能性フラグメント）は、癌細胞などの細胞の成長を遅延させるかまたは阻害するために投与され得る。これらの適用において、治療有効量の抗体が、癌細胞の成長、複製もしくは転移を阻害するため、または癌の徴候もしくは症状を阻害するために十分な量で被験体に投与される。いくつかの実施形態において、本抗体は、転移の発生を阻害するためまたは予防するため、または微小転移巣などの転移（metastases）、例えば、領域リンパ節への微小転移巣のサイズもしくは数を減少させるために、被験体に投与される（Gotora, Clin. Cancer Res. 14 (11) : 3401 - 3407, 2008）。

10

#### 【0232】

適当な被験体は、HMW - MAA を発現する癌（例えば、メラノーマ、前立腺癌、扁平上皮癌腫（例えば、頭頸部扁平上皮癌腫）、乳癌（基底細胞型乳癌腫、腺管癌腫および小葉性乳癌腫を含むがこれらに限定されない）、白血病（例えば、急性骨髄性白血病および11q23陽性急性白血病）、神経堤腫瘍（例えば、星状細胞腫、神経膠腫または神経芽細胞腫）、卵巣癌、結腸癌、胃癌、膵癌、骨癌（例えば、脊索腫）、神経膠腫または肉腫（例えば、軟骨肉腫）であるがこれらに限定されない）と診断された被験体を含み得る。

20

#### 【0233】

ヒトHMW - MAA 特異的抗体の治療有効量は、疾患の重症度および患者の全般的な健康状態に依存する。その抗体の治療有効量は、症状の主観的な軽減、または臨床医もしくは他の適格な観察者によって述べられるような客観的に同定可能な改善を提供する量である。これらの組成物は、同時にまたは順次、別の化学療法剤とともに投与され得る。

#### 【0234】

現在、多くの化学療法剤が当該分野で公知である。1つの実施形態において、化学療法剤は、有糸分裂インヒビター、アルキル化剤、抗代謝産物、挿入抗生物質（intercalating antibiotics）、成長因子インヒビター、細胞周期インヒビター、酵素、トポイソメラーゼインヒビター、抗生存剤（anti-survival agents）、生物学的応答改変因子（modifiers）、抗ホルモン、例えば、抗アンドロゲンおよび抗血管新生剤からなる群から選択される。

30

#### 【0235】

抗血管新生剤（例えば、MMP - 2（マトリックス - メタロプロテイナーゼ2）インヒビター、MMP - 9（マトリックス - メタロプロテイナーゼ9）インヒビターおよびCOX - II（シクロオキシゲナーゼII）インヒビター）が、本発明の化合物とともに使用され得る。有用なCOX - IIインヒビターの例としては、CELEBREX<sup>TM</sup>（セレコキシブ（alecoxib））、バルデコキシブおよびロフェコキシブが挙げられる。有用なマトリックスメタロプロテイナーゼインヒビターの例は、PCT公開番号WO96 / 33172（1996年10月24日公開）、PCT公開番号WO96 / 27583（1996年3月7日公開）、欧州特許出願番号97304971.1（1997年7月8日出願）、欧州特許出願番号99308617.2（1999年10月29日出願）、PCT公開番号WO98 / 07697（1998年2月26日公開）、PCT公開番号WO98 / 03516（1998年1月29日公開）、PCT公開番号WO98 / 34918（1998年8月13日公開）、PCT公開番号WO98 / 34915（1998年8月13日公開）、PCT公開番号WO98 / 33768（1998年8月6日公開）、PCT公開番号WO98 / 30566（1998年7月16日公開）、欧州特許公開606,046（1994年7月13日公開）、欧州特許公開931,788（1999年7月28日公開）、PCT公開番号WO90 / 05719（1990年5月31日公開）、PCT

40

50

T公開番号WO99/52910(1999年10月21日公開)、PCT公開番号WO99/52889(1999年10月21日公開)、PCT公開番号WO99/29667(1999年6月17日公開)、PCT国際出願番号PCT/IB98/01113(1998年7月21日出願)、欧州特許出願番号99302232.1(1999年3月25日出願)、米国特許第5,863,949号(1999年1月26日発行)、米国特許第5,861,510号(1999年1月19日発行)および欧州特許公開780,386(1997年6月25日公開)に記載されている。1つの例において、MMPインヒビターは、投与されたときに関節痛を誘導しない。別の例において、MMPインヒビターは、他のマトリックス-メタロプロテイナーゼ(例えば、MMP-1、MMP-3、MMP-4、MMP-5、MMP-6、MMP-7、MMP-8、MMP-10、MMP-11、MMP-12およびMMP-13)と比べてMMP-2および/またはMMP-9を選択的に阻害する。有用なMMPインヒビターのいくつかの具体的な例は、AG-3340、RO32-3555、RS13-0830、3-[4-(4-フルオロ-フェノキシ)-ベンゼンスルホニル]-1-ヒドロキシカルバモイル-シクロペンチル)-アミノ]-プロピオン酸;3-エキソ-3-[4-(4-フルオロ-フェノキシ)-ベンゼンスルホニルアミノ]-8-オキサ-ピシクロ[3.2.1]オクタン-3-カルボン酸ヒドロキシアミド;(2R,3R)1-[4-(2-クロロ-4-フルオロ-ベンジルオキシ)-ベンゼンスルホニル]-3-ヒドロキシ-3-メチル-ピペリジン-2-カルボン酸ヒドロキシアミド;4-[4-(4-フルオロ-フェノキシ)-ベンゼンスルホニルアミノ]-テトラヒドロ-ピラン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド;3-[4-(4-フルオロ-フェノキシ)-ベンゼンスルホニル]-1-ヒドロキシカルバモイル-シクロブチル)-アミノ]-プロピオン酸;4-[4-(4-クロロ-フェノキシ)-ベンゼンスルホニルアミノ]-テトラヒドロ-ピラン-4-カルボン酸ヒドロキシアミド;(R)3-[4-(4-クロロ-フェノキシ)-ベンゼンスルホニルアミノ]-テトラヒドロ-ピラン-3-カルボン酸ヒドロキシアミド;(2R,3R)1-[4-(4-フルオロ-2-メチル-ベンジルオキシ)-ベンゼンスルホニル]-3-ヒドロキシ-3-メチル-ピペリジン-2-カルボン酸ヒドロキシアミド;3-[4-(4-フルオロ-フェノキシ)-ベンゼンスルホニル]-1-ヒドロキシカルバモイル-1-メチル-エチル)-アミノ]-プロピオン酸;3-[4-(4-フルオロ-フェノキシ)-ベンゼンスルホニル]-4-ヒドロキシカルバモイル-テトラヒドロ-ピラン-4-イル)-アミノ]-プロピオン酸;3-エキソ-3-[4-(4-クロロ-フェノキシ)-ベンゼンスルホニルアミノ]-8-オキサ-シクロ[3.2.1]オクタン-3-カルボン酸ヒドロキシアミド;3-エンド-3-[4-(4-フルオロ-フェノキシ)-ベンゼンスルホニルアミノ]-8-オキサ-シクロ[3.2.1]オクタン-3-カルボン酸ヒドロキシアミド;および(R)3-[4-(4-フルオロ-フェノキシ)-ベンゼンスルホニルアミノ]-テトラヒドロ-フラン-3-カルボン酸ヒドロキシアミド;ならびに前記化合物の薬学的に許容可能な塩および溶媒和化合物である。

#### 【0236】

HMW-MAAに特異的に結合する抗体はまた、シグナル伝達インヒビター(例えば、EGF-R(上皮成長因子レセプター)応答を阻害し得る作用物質、例えば、EGF-R抗体、EGF抗体およびEGF-Rインヒビターである分子;VEGF(血管内皮成長因子)インヒビター(例えば、VEGFレセプターおよびVEGFを阻害し得る分子);およびerbB2レセプターインヒビター(例えば、erbB2レセプターに結合する有機分子または抗体、例えば、HERCEPTIN<sup>TM</sup>(Genentech, Inc.))とともに使用され得る。EGF-Rインヒビターは、例えば、PCT公開番号WO95/19970(1995年7月27日公開)、WO98/14451(1998年4月9日公開)、WO98/02434(1998年1月22日公開)および米国特許第5,747,498号(1998年5月5日発行)に記載されている。EGFR阻害剤としては、モノクローナル抗体C225および抗EGFR22Mab(ImClone Systems Incorporated)、ABX-EGF(Abgenix/Cell Ge

10

20

30

40

50

nesys)、EMD-7200(Merck KgaA)、EMD-5590(Merck KgaA)、MDX-447/H-477(Medarex Inc.およびMerck KgaA)、ならびに化合物ZD-1834、ZD-1838およびZD-1839(AstraZeneca)、PKI-166(Novartis)、PKI-166/CGP-75166(Novartis)、PTK787(Novartis)、CP701(Cephalon)、レフルノミド(Pharmacia/Sugen)、Cl-1033(Warner Lambert Parke Davis)、Cl-1033/PD183,805(Warner Lambert Parke Davis)、CL-387,785(Wyeth-Ayerst)、BBR-1611(Boehringer Mannheim GmbH/Roche)、ナアミジン(Naamidine)A(Bristol Myers Squibb)、RC-3940-II(Pharmacia)、BIBX-1382(Boehringer Ingelheim)、OLX-103(Merck & Co.)、VRCTC-310(Ventech Research)、EGF融合トキシン(Seragen Inc.)、DAB-389(Seragen/Lilgand)、ZM-252808(Imperial Cancer Research Fund)、RG-50864(INSERM)、LFM-A12(Parker Hughes Cancer Center)、WHI-P97(Parker Hughes Cancer Center)、GW-282974(Glaxo)、KT-8391(Kyowa Hakko)およびEGF-Rワクチン(York Medical/Centro de Immunologia Molecular(CIM))も挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0237】

VEGFインヒビター、例えば、SU-5416およびSU-6668(Sugen Inc.)、SH-268(Schering)およびNX-1838(Nexstar)もまた、HMW-MAAに特異的に結合する抗体とともに使用され得る。VEGFインヒビターは、例えば、PCT公開番号WO99/24440(1999年5月20日公開)、PCT国際出願PCT/IB99/00797(1999年5月3日出願)、PCT公開番号WO95/21613(1995年8月17日公開)、PCT公開番号WO99/61422(1999年12月2日公開)、米国特許第5,834,504号(1998年11月10日発行)、PCT公開番号WO98/50356(1998年11月12日公開)、米国特許第5,883,113号(1999年3月16日発行)、米国特許第5,886,020号(1999年3月23日発行)、米国特許第5,792,783号(1998年8月11日発行)、PCT公開番号WO99/10349(1999年3月4日公開)、PCT公開番号WO97/32856(1997年9月12日公開)、PCT公開番号WO97/22596(1997年6月26日公開)、PCT公開番号WO98/54093(1998年12月3日公開)、PCT公開番号WO98/02438(1998年1月22日公開)、WO99/16755(1999年4月8日公開)およびPCT公開番号WO98/02437(1998年1月22日公開)に記載されている。いくつかの特異的VEGFインヒビターの他の例は、IM862(Cytran Inc.); Genentech, Inc.の抗VEGFモノクローナル抗体;ならびにRibozymeおよびChiron製の合成リボザイムであるアンギオザイム(angiozyme)である。これらおよび他のVEGFインヒビターは、HMW-MAAに特異的に結合する抗体とともに使用され得る。

#### 【0238】

さらに、GW-282974(Glaxo Wellcome pic)などのErbB2レセプターインヒビター、ならびにモノクローナル抗体AR-209(Aronex Pharmaceuticals Inc.)および2B-1(Chiron)、例えば、PCT公開番号WO98/02434(1998年1月22日公開)、PCT公開番号WO99/35146(1999年7月15日公開)、PCT公開番号WO99/35132(1999年7月15日公開)、PCT公開番号WO98/02437(1998

年1月22日公開)、PCT公開番号WO97/13760(1997年4月17日公開)、PCT公開番号WO95/19970(1995年7月27日公開)、米国特許第5,587,458号(1996年12月24日発行)および米国特許第5,877,305号(1999年3月2日発行)に示されているものが、本発明の化合物と併用され得る。有用なErbb2レセプターインヒビターは、1999年1月27日出願の米国仮出願番号60/117,341および1999年1月27日出願の米国仮出願番号60/117,346にも記載されている。

#### 【0239】

メラノーマなどの癌を処置するために、本明細書中に開示される抗体は、外科的処置、またはダカルバジン(DTICとも呼ばれる)もしくはインターロイキン-2(IL-2)もしくはインターフェロン(IFN)などのインターフェロンを含む別の治療薬とともに使用され得る。表在性黒色腫を処置するために、本抗体は、イミキモドとともに使用され得る。前立腺癌を処置するために、本抗体は、例えば、外科術、放射線治療、化学療法およびホルモン治療(例えば、抗アンドロゲンまたはGnRHアンタゴニスト)とともに使用され得る。HNSCCを処置するために、本明細書中に提供される抗体は、外科術、放射線治療、化学療法、他の抗体(例えば、セツキシマブおよびペバシズマブ)または小分子治療薬(例えば、エルロチニブ)とともに使用され得る。

10

#### 【0240】

本組成物の単回または複数回投与は、患者が必要とし、耐容するような投薬量および頻度に応じて投与される。任意の事象において、本組成物は、患者を効果的に処置するのに十分な量の、本明細書中に開示される抗体(またはその機能性フラグメント)の少なくとも1つを提供するべきである。投薬量は、1回投与され得るが、治療結果が達成されるまでまたは副作用によって治療の中断を余儀なくされるまで定期的に適用され得る。1つの例において、ある用量の抗体は、1日おきに30分間にわたって注入される。この例では、約1~約10回、投与され得る(例えば、3または6回、1日おきに投与され得る)。さらなる例において、持続注入が、約5~約10日間にわたって投与される。被験体は、所望の治療結果が達成されるまで、毎月などの一定間隔で処置され得る。一般に、その用量は、許容できない毒性を患者にもたらさずに疾患の症状または徴候を処置するかまたは回復させるのに十分な量である。

20

#### 【0241】

非経口用徐放製剤は、埋没物、油性注射または粒子状の系として生成され得る。タンパク質送達系の広範な概要については、Banga, A. J., Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, (1995)(本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。粒子状の系としては、ミクロスフェア、微小粒子、マイクロカプセル、ナノカプセル、ナノスフェアおよびナノ粒子が挙げられる。マイクロカプセルは、中核として細胞毒または薬物などの治療用タンパク質を含む。ミクロスフェアでは、治療薬は、粒子全体に分散される。約1 $\mu$ mより小さい粒子、ミクロスフェアおよびマイクロカプセルは、通常、それぞれナノ粒子、ナノスフェアおよびナノカプセルと呼ばれる。毛細管は、約5 $\mu$ mの直径を有し、ナノ粒子だけが静脈内投与される。微小粒子は、代表的には、およそ100 $\mu$ mの直径であり、皮下または筋肉内に投与される。例えば、Kreuter, J., Colloidal Drug Delivery Systems, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, NY, pp. 219-342(1994); および Tice & Tabibi, Treatise on Controlled Drug Delivery, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp. 315-339, (1992)(この両方が、本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。

30

40

#### 【0242】

50

ポリマーは、本明細書中に開示される抗体組成物のイオン徐放のために使用され得る。制御された薬物送達において使用するための様々な分解性および非分解性のポリマーマトリックスは、当該分野で公知である (Langer, Accounts Chem. Res. 26: 537-542, 1993)。例えば、ブロック共重合体である polaxamer 407 は、低温では粘稠性であるが移動性の液体として存在するが、体温では半固体ゲルを形成する。polaxamer 407 は、組換えインターロイキン-2 およびウレアーゼの製剤化および持続送達にとって有効なビヒクルであると示されている (Johnstonら、Pharm. Res. 9: 425-434, 1992; および Pecaら、J. Parent. Sci. Tech. 44(2): 58-65, 1990)。あるいは、ヒドロキシアパタイトが、タンパク質の徐放用のマイクロキャリアとして使用されている (Ijntemaら、Int. J. Pharm. 112: 215-224, 1994)。なおも別の態様において、リポソームは、徐放、ならびに脂質でカプセル化された薬物の薬物標的化のために使用される (Betageriら、Liposome Drug Delivery Systems, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA (1993))。治療用タンパク質の制御送達のための多くのさらなる系が知られている (米国特許第 5, 055, 303 号; 米国特許第 5, 188, 837 号; 米国特許第 4, 235, 871 号; 米国特許第 4, 501, 728 号; 米国特許第 4, 837, 028 号; 米国特許第 4, 957, 735 号; 米国特許第 5, 019, 369 号; 米国特許第 5, 055, 303 号; 米国特許第 5, 514, 670 号; 米国特許第 5, 413, 797 号; 米国特許第 5, 268, 164 号; 米国特許第 5, 004, 697 号; 米国特許第 4, 902, 505 号; 米国特許第 5, 506, 206 号; 米国特許第 5, 271, 961 号; 米国特許第 5, 254, 342 号および米国特許第 5, 534, 496 号を参照のこと)。

#### 【0243】

エフェクター分子に共有結合的に連結された、HMW-MAA に特異的に結合する完全ヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメントは、放射免疫療法または放射免疫ガイド下手術をはじめとした種々の目的のために使用され得る。例えば、HMW-MAA 抗体は、放射性同位体に連結されて、免疫療法において使用されることにより、HMW-MAA を発現する腫瘍を処置し得る。放射性同位体に共有結合的に連結されたヒト HMW-MAA 抗体は、放射免疫ガイド下手術において腫瘍の位置を特定するために有用であり、その結果、腫瘍が外科的に除去され得る。1つの実施形態において、約 10 mCi の放射標識されたヒト HMW-MAA モノクローナル抗体が、被験体に投与される。他の実施形態において、約 15 mCi、約 20 mCi、約 50 mCi、約 75 mCi または約 100 mCi の放射標識されたヒト HMW-MAA モノクローナル抗体が、被験体に投与される。他の実施形態において、約 100 mCi ~ 約 100 mCi の放射標識されたヒト HMW-MAA モノクローナル抗体が、被験体に投与される。

#### 【0244】

被験体内の腫瘍を検出する方法は、放射性同位体などのエフェクター分子に複合体化された、HMW-MAA に特異的に結合するヒト抗体またはその機能性フラグメントの投与を包含する。投与された放射標識抗体を腫瘍に局在化させるのに十分な長さの時間が経過した後、腫瘍が検出される。1つの具体的で非限定的な例において、放射標識された免疫結合体は、手持ち式のガンマ検出プローブを用いて検出される。いくつかの実施形態において、腫瘍は、MRI、CT スキャンまたは PET スキャンによって検出される。HMW-MAA を発現している原発腫瘍、転移した腫瘍または細胞が、検出され得る。例えば、放射性同位体などのエフェクター分子に複合体化されたヒト HMW-MAA モノクローナル抗体が、被験体に投与された後、外科術または処置が行われる。1つの具体的な実施形態において、外科術の前に検出工程が行われることにより、腫瘍の位置が特定される。別の実施形態において、検出工程は、例えば、腫瘍の位置を検出するために外科術中に行われ、その後、放射免疫ガイド下手術などにおいて、その腫瘍が除去される。放射性同位体などのエフェクター分子に複合体化されたヒト HMW-MAA モノクローナル抗体は、外

科術後または処置後にも被験体に投与され得、それにより、その処置の有効性が判定される（例えば、腫瘍が完全に除去されたことが保証されるか、または腫瘍の再発が検出される）。このように、本抗体は、治療用薬剤（例えば、腫瘍に対する免疫療法用）として、または放射免疫ガイド下手術を行うために有用である。

【0245】

VI. 診断方法およびキット

HMW - MAAの発現をインビトロまたはインビボにおいて検出するための方法が本明細書中で提供される。1つの例において、HMW - MAAの発現は、生物学的サンプル中において検出される。そのサンプルは、任意のサンプル（生検、剖検および病理検体の組織を含むがこれらに限定されない）であり得る。生物学的サンプルには、組織の切片、例えば、組織学的な目的のために採取された凍結切片も含まれる。生物学的サンプルには、さらに体液（例えば、血液、血清、血漿、痰、髄液または尿）が含まれる。

10

【0246】

いくつかの実施形態において、悪性腫瘍（例えば、メラノーマ、前立腺癌、扁平上皮癌腫（例えば、頭頸部扁平上皮癌腫）、乳癌（基底細胞型乳癌腫、腺管癌腫および小葉性乳癌腫を含むがこれらに限定されない）、白血病（例えば、急性骨髄性白血病および11q23陽性急性白血病）、神経堤腫瘍（例えば、星状細胞腫、神経膠腫または神経芽細胞腫）、卵巣癌、結腸癌、胃癌、膵癌、骨癌（例えば、脊索腫）、神経膠腫または肉腫（例えば、軟骨肉腫））を検出するための方法が提供される。HMW - MAA陽性癌を有する患者由来の血清サンプルは、検出可能な量のHMW - MAAを含む（Vergilisら、*J. Invest. Dermatol.* 125: 526 - 531, 2005; Ulmerら、*Clin. Cancer Res.* 10: 531 - 537, 2004）。したがって、HMW - MAAに特異的に結合する抗体またはその機能性フラグメントは、被験体由来の血清サンプル中のHMW - MAAを検出するため、被験体内の癌を検出するため、または被験体内の癌の診断を確認するために使用され得る。

20

【0247】

本開示は、生物学的サンプル中のHMW - MAAを検出するための方法を提供し、ここで、その方法は、免疫結合体の形成をもたらす条件下において生物学的サンプルを、HMW - MAAに結合するヒト抗体またはその機能性フラグメントと接触させる工程、およびその免疫結合体を検出することにより、その生物学的サンプル中のHMW - MAAを検出する工程を包含する。1つの例において、そのサンプル中のHMW - MAAの検出は、その被験体が悪性腫瘍を有することを示唆する。別の例において、そのサンプル中のHMW - MAAの検出は、被験体内の癌の診断を確認する。さらなる例において、HMW - MAAの検出は、転移の存在を確認するかまたは検出する。

30

【0248】

いくつかの実施形態において、HMW - MAAに特異的に結合する完全ヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメントは、被験体内の腫瘍の診断の確認などの被験体内の腫瘍の検出または診断のために使用される。他の実施形態において、HMW - MAAに特異的に結合する完全ヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメントは、治療の有効性を検出するために使用される。例えば、HMW - MAAを発現する既知の悪性腫瘍を有する被験体に、治療用薬剤が投与される。その方法は、免疫結合体の形成をもたらす条件下において生物学的サンプルを、HMW - MAAに結合するヒト抗体またはその機能性フラグメントと接触させる工程、およびその免疫結合体を検出することにより、その生物学的サンプル中のHMW - MAAを検出する工程を包含し得る。処置前の被験体由来のサンプルなどのコントロールまたは対照基準と比べたときのHMW - MAAの量の減少は、その治療用薬剤が、悪性腫瘍の処置に効果的であることを示唆する。いくつかの例において、コントロールと比べたときのHMW - MAAの量の増加は、その治療用薬剤がその悪性腫瘍の処置に効果的でないことを示唆する。

40

【0249】

いくつかの実施形態において、検出は、インビボにおけるものであり得る。HMW -

50

M A A に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体またはその機能性フラグメントは、放射性同位体に複合体化され得る。投与された放射標識抗体を腫瘍に局在化させるのに十分な長さの時間が経過した後、その腫瘍は、MRI、CTスキャンまたはPETスキャンなどによって検出される。

**【0250】**

1つの実施形態において、HMW - M A A に特異的に結合するヒト抗体またはその機能性フラグメントは、検出可能な標識で直接標識される。別の実施形態において、HMW - M A A に特異的に結合するヒト抗体またはその機能性フラグメント（1次抗体）は、標識されず、HMW - M A A に特異的に結合するヒト抗体に結合し得る2次抗体または他の分子が、標識される。当業者に周知であるように、特定の種およびクラスの1次抗体に特異的に結合することができる2次抗体が、選択される。例えば、1次抗体がヒトIgGである場合、2次抗体は、抗ヒトIgGであり得る。抗体に結合し得る他の分子としては、プロテインAおよびプロテインG（この両方は商業的に入手可能である）が挙げられるがこれらに限定されない。

10

**【0251】**

本抗体または2次抗体に適した標識は、上に記載されたものであり、それらとしては、様々な酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、磁性物質および放射性材料が挙げられる。適当な酵素の非限定的な例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ - ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが挙げられる。適当な補欠分子族複合体の非限定的な例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられる。適当な蛍光材料の非限定的な例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンが挙げられる。非限定的で例示的な発光材料は、ルミノールであり；非限定的で例示的な磁性物質は、ガドリニウムであり、非限定的で例示的な放射性標識としては、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{19}\text{F}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ および $^{125}\text{I}$ が挙げられる。

20

**【0252】**

代替の実施形態において、HMW - M A A は、検出可能な物質で標識されたHMW - M A A 標準物質およびHMW - M A A に特異的に結合する標識されていないヒト抗体を利用する競合イムノアッセイによって、生物学的サンプル中でアッセイされ得る。このアッセイでは、生物学的サンプル、標識されたHMW - M A A 標準物質およびHMW - M A A に特異的に結合するヒト抗体またはその機能性フラグメントが混合され、標識されていない抗体に結合した標識HMW - M A A 標準物質の量が測定される。生物学的サンプル中のHMW - M A A の量は、HMW - M A A に特異的に結合する抗体またはその機能性フラグメントに結合した標識HMW - M A A 標準物質の量に反比例する。

30

**【0253】**

本明細書中に開示されるイムノアッセイおよび方法は、いくつかの目的のために使用され得る。1つの実施形態において、HMW - M A A に特異的に結合するヒト抗体またはその機能性フラグメントは、細胞培養における細胞内のHMW - M A A の産生を検出するために使用され得る。別の実施形態において、その抗体は、生物学的サンプル中のHMW - M A A の量を検出するために使用され得る。HMW - M A A の高発現は、いくつかのタイプの癌（メラノーマ、乳癌、前立腺癌、神経膠腫および扁平上皮癌腫を含むがこれらに限定されない）と関連する。1つの実施形態において、血清サンプルまたは組織サンプルなどの生物学的サンプル中のHMW - M A A を検出するためのキットが提供される。例えば、被験体内の癌の診断を確認するために、生検を行うことにより、組織学的検査用の組織サンプルが得られ得る。あるいは、HMW - M A A タンパク質の存在を検出するために、血清サンプルが得られ得る。ポリペプチドを検出するためのキットは、代表的には、本明細書中に開示される抗体のいずれかなどのHMW - M A A に特異的に結合するヒト抗体を備え得る。いくつかの実施形態において、抗体フラグメント（例えば、Fvフラグメント

40

50

もしくは s c F v または F a b ) が、そのキット内に含まれる。さらなる実施形態において、その抗体は、標識される（例えば、蛍光標識、放射性標識または酵素標識で）。

【0254】

1つの実施形態において、キットは、HMW-MAAに特異的に結合する抗体を使用する手段を開示している指示材料を備える。その指示材料は、電子的形態で記載されたものであり得るか（例えば、コンピュータディスクまたはコンパクトディスク）または視覚的なものであり得る（例えば、ビデオファイル）。そのキットは、そのキットが予定している特定の適用を容易にするさらなる構成要素も備え得る。したがって、例えば、そのキットは、さらに、標識を検出する手段（例えば、酵素標識用の酵素基質、蛍光標識を検出するフィルターセット、2次抗体などの適切な2次標識など）を備え得る。そのキットは、さらに、特定の方法の実施するために日常的に使用される緩衝液および他の試薬を備え得る。そのようなキットおよび適切な内容物は、当業者に周知である。

10

【0255】

1つの実施形態において、診断キットは、イムノアッセイを含む。イムノアッセイの詳細は、使用される特定の形式によって異なり得るが、生物学的サンプル中のHMW-MAAを検出する方法は、一般に、免疫学的に反応性の条件下において、HMW-MAAポリペプチドと特異的に反応する抗体または抗体フラグメントと生物学的サンプルとを接触させる工程を包含する。その抗体は、免疫学的に反応性の条件下において、免疫結合体を形成するように特異的に結合することが可能であり、その免疫結合体（結合した抗体）の存在は、直接または間接的に検出される。

20

【0256】

細胞表面マーカーが存在することまたは存在しないことを判定する方法は、当該分野で周知である。例えば、本抗体は、他の化合物（酵素、磁気ビーズ、コロイド状磁気ビーズ、ハプテン、蛍光色素、金属化合物、放射性化合物または薬物を含むがこれらに限定されない）に結合体化され得る。本抗体は、イムノアッセイ（例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）または免疫組織化学的アッセイであるがこれらに限定されない）においても利用され得る。本抗体は、蛍光顕微鏡検査または蛍光励起細胞分取（FACS）にも使用され得る。FACSは、他の高性能の検出レベルの中でも、複数のカラーチャネル、低角度光散乱検出チャネルおよび鈍角光散乱検出チャネルならびにインピーダンスチャネルを使用することにより、細胞を分離するかまたは選別する（米国特許第5,061,620号を参照のこと）。本明細書中に開示されるようなHMW-MAAに特異的に結合するヒト抗体のいずれかは、これらのアッセイにおいて使用され得る。したがって、本抗体は、従来のイムノアッセイ（ELISA、RIA、FACS、組織免疫組織化学、ウエスタンブロットまたは免疫沈降を含むがこれらに限定されない）において使用され得る。

30

【0257】

VII. ペプチド模倣物

HMW-MAAのペプチド模倣物もまた本明細書中に提供される。そのペプチド模倣物は、HMW-MAAに特異的なヒトモノクローナル抗体に特異的に結合する。そのペプチド模倣物は、HMW-MAA特異的ヒトモノクローナル抗体 s c F v C 2 1 を用いたペプチドライブラリーのパニングによって同定された。HMW-MAAペプチド模倣物は、例えば、メラノーマなどのHMW-MAA陽性癌と診断された被験体においてHMW-MAA特異的免疫応答を誘発するために使用され得る。

40

【0258】

HMW-MAAに特異的なヒトモノクローナル抗体に結合する単離されたペプチドが、本明細書中に提供され、ここで、そのペプチドは、コンセンサスモチーフ P X X Y X P X X D（配列番号9）を含む。ペプチド模倣物は、一般に、約10～約20アミノ酸長（例えば、約13～約17または約15アミノ酸長）である。いくつかの実施形態において、そのペプチドは、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20アミノ酸長である。いくつかの例において、そのペプチドのアミノ酸配列は、配列番

50

号7、配列番号10、配列番号13、または配列番号7、配列番号10もしくは配列番号13の改変体を含み、ここで、その改変体は、3つ以下、2つ以下または1つ以下のアミノ酸の置換を含む。特定の例において、そのペプチドのアミノ酸配列は、配列番号7、配列番号10または配列番号13からなる。

【0259】

被験体においてHMW - MAA特異的免疫を誘導する方法もまた提供され、その方法は、その被験体に、コンセンサスモチーフPXXYXPXXD（配列番号9）を含むペプチドを投与する工程を包含する。

【0260】

以下の実施例は、ある特定の特徵および/または実施形態を例証するために提供される。これらの実施例は、本開示を、記載される特定の特徵または実施形態に限定すると解釈されるべきでない。

10

【実施例】

【0261】

実施例1：材料および方法

細胞株、細胞溶解産物および組織

ヒトメラノーマ細胞株Colo38、FO-1およびMelurならびにヒトBリンパ系細胞株LG2を、10%血清+栄養補助剤(BioWhittaker, Walkersville, MD)および2mM L-グルタミン(BioWhittaker)が補充されたRPMI1640培地(Tissue Culture Media Facility, Roswell Park Cancer Institute (RPCI), Buffalo, NY)中で維持した。ヒトメラノーマ細胞株M14およびSK-MEL-28、ヒト線維芽細胞FF2376、ヒト乳癌腫細胞株T47D、ヒト膀胱癌腫細胞株T24、ヒト前立腺癌腫細胞株PC3、ヒトBリンパ系細胞株JYおよびLKT13、ならびにラット神経細胞株B49を、10%ウシ胎児血清(FBS)(BioWhittaker)および2mM L-グルタミンが補充されたRPMI1640培地中で維持した。pcDNA3.1<sup>TM</sup>(+)のプラスミドDNA/完全長のHMW - MAA DNA構築物を用いてM14細胞をトランスフェクションした後にHMW - MAAを発現するM14/HMW - MAA細胞(Yangら、J Cell Biol 165:881-891, 2004)を、10%FBS、2mM L-グルタミンおよび0.4mg/ml G418(Promega, Madison, WI)が補充されたRPMI1640培地中で生育した。37℃、5%CO<sub>2</sub>雰囲気中で細胞を培養した。報告されているように(Desaiら、Cancer Res 58:2417-2425, 1998(本明細書中で参考として援用される))、細胞溶解産物を調製した。メラノサイト起源の病変は、Kumamoto University School of Medicine(Kumamoto, Japan)のDepartment of Dermatologyにおいて外科術を受けた患者から得た。メラノーマ病変の診断は、組織病理学的特徴に基づいた。以前に報告されているように(Desaiら、Cancer Res 58:2417-2425, 1998(本明細書中で参考として援用される))、凍結組織切片およびホルマリン固定組織切片を調製した。

20

30

40

【0262】

動物

8週齢の雌BALB/cマウスをRPCIの動物コア施設から入手した。

【0263】

モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、scFv抗体ならびに試薬

HMW - MAA特異的マウスmAb149.53、225.28、763.74、TP61.5ならびにVF1-TP34およびVF1-TP41.2を、他で報告されているように(Wilsonら、Int J Cancer, 28:293-300, 1981; Giacominiら、Cancer Res 43:3586-3590, 1983; Chenら、Cancer Res 51:4790-4797, 1991; Temp

50

oniら、Cancer Res 52:2497-2503, 1992) 作製し、特徴づけた。この6種のmAbは、HMW-MAA<sup>+</sup>メラノーマ細胞への結合において互いを相互阻害(cross-inhibit)しないので、相互阻止(Cross-blocking)実験から、これらが別々かつ空間的に遠い抗原決定基を認識すると示された(Campoliら、Crit Rev Immunol 24:267-296, 2004)。100KD特異的マウスmAb376.96(Imaiら、J Natl Cancer Inst 68:761-769, 1982)、HLAクラスI抗原特異的マウスmAb TP25.99(Desaiら、J Immunol 165:3275-3283, 2000)、c-myc腫瘍性タンパク質特異的マウスmAb 9E10(Evanら、Mol Cell Biol 5:3610-3616, 1985)およびマウス抗id mAb MK2-23(Kusamaら、J Immunol 143:3844-3852, 1989)が、以前に報告されている。HMW-MAA特異的ヒトscFv#28(Noronhaら、J. Immunol 161:2968-2976, 1998)、#61(Desaiら、Cancer Res 58:2417-2425, 1998)および#70(Noronhaら、J. Immunol 161:2968-2976, 1998)ならびに抗-id scFv#119(Wangら、Idiotypes in Medicine: Autoimmunity, Infection and Cancer p.523, 1997)を、それぞれメラノーマ細胞S5、精製HMW-MAA、メラノーマ細胞SK-MEL-28および抗id mAb MK2-23を用いたパニングによって、合成scFvライブラリー(#1)(Nissimら、Embo J 13:692-698, 1994)から単離した。MAA特異的ヒトscFv F98およびW34は、それぞれメラノーマ細胞FO-1およびWM1158を用いたパニングによって半合成scFvライブラリー(de Kruijffら、J Mol Biol 248:97-105, 1995)から単離した。

#### 【0264】

マウスmAbは、連続的な硫酸塩析およびカプリル酸沈殿によって腹水から精製した(Temponiら、Hybridoma 8:85-95, 1989)。mAb調製物の純度および活性を、それぞれSDS-PAGE、および結合アッセイにおける対応抗原を用いた試験によって評価した。モノクローナル抗体および精製scFv抗体を、NHS-LC-ビオチン(Pierce, Rockford, IL)を製造者の指示書に従って使用してビオチン化した。mAb 9E10を、製造者の指示書に従ってHiTrap NHS活性化セファロースカラム(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)上に固定化した。

#### 【0265】

ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体(SA-HRP)は、Pierceから購入した。HRP-抗マウスIgG Fc抗体は、Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PAから購入した。ヤギ抗マウスIg抗体のR-フィコエリトリン(RPE)標識F(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、BD Pharmingen, San Diego, CAから購入した。

#### 【0266】

##### ファージディスプレイライブラリー

意図されたCDR3を含む大きな半合成ファージディスプレイscFv抗体ライブラリーを、報告されているように(de Kruijffら、J Mol Biol 248:97-105, 1995)構築した。15アミノ酸のランダムな線状ペプチドをディスプレイするファージディスプレイペプチドライブラリーX15、および12アミノ酸のランダムなジスルフィド拘束ペプチドをディスプレイするLX-8(XCX8CX)を、報告されているように(Bonnycastleら、J Mol Biol 258:747-762, 1996)構築した。

#### 【0267】

10

20

30

40

50

## 合成ペプチド

ペプチドは、RPCI Biopolymer Core Facility (Buffalo, NY) から購入した。システイン残基を含むペプチドP1C21を、6mMフェリシアン化カリウムを用いて環化し、逆相HPLCで精製した。その組成物およびジスルフィド結合形成を質量分析によって確認した。ペプチドの純度は、HPLCによって評価したとき、95%超だった。ペプチドを水で5mMの濃度に再構成し、分注し、-20℃で保存した。水に不溶性であるペプチドP1C21をジメチルスルホキシド(DMSO)で5mMの濃度に再構成した。ペプチドを、報告されているように(Grant, Current Protocols in Immunology p.9.2.8, 2002)カップリング剤のマレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミド(MBS)(Pierce)を用いてキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)(Pierce)に結合体化した。

10

### 【0268】

#### ファージディスプレイscFv抗体の選択

メラノーマ細胞に結合しているファージディスプレイscFv抗体を、報告されているように(Noronhaら、J Immunol 161:2968-2976, 1998(本明細書中で参考として援用される))パニング法を利用してファージディスプレイscFv抗体ライブラリーから単離した。

### 【0269】

#### 可溶性scFv抗体の調製および精製

可溶性scFv抗体は、報告されているように(Schierら、J Mol Biol 255:28-43, 1996(本明細書中で参考として援用される))イソプロピル-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)(Roche Applied Science, Indianapolis, IN)による誘導によって、個別のアンピシリン耐性大腸菌TG1感染コロニーから産生された。可溶性scFv抗体を、個別の細菌コロニーの培養物の培養上清(SNT)または細胞周辺腔(細胞周辺調製物, PP)から回収した。RPAS精製モジュール(Amersham)について報告された方法に従って、scFv抗体を、不溶化されたmAb 9E10におけるアフィニティークロマトグラフィによってSNTまたはPPから精製した。精製されたscFv抗体を、Centricon10(Millipore Corporation, Bedford, MA)を製造者の指示書に従って使用して、濃縮した。scFv抗体調製物の純度および活性を、それぞれPhastSystem<sup>TM</sup>(Amersham)を利用するSDS-PAGE、および酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)を利用する対応抗原を用いた試験によって評価した。

20

30

### 【0270】

#### 結合アッセイ

合成ペプチドおよびメラノーマ細胞に対する可溶性scFv抗体の反応性、ならびにメラノーマ細胞およびペプチドに対するマウス免疫血清の反応性を試験するELISAを、報告されているように(Desaiら、Cancer Res 58:2417-2425, 1998; Desaiら、J Immunol 165:3275-3283, 2000; Matsuiら、J Immunol 139:2088-2095, 1987)行った。結果は、450nmにおける光学濃度(O.D.)の吸光度として表される。scFv C21によって認識される抗原決定基をマッピングする競合アッセイは、ビオチン化scFv C21(0.25μg/ウェル)をマウスmAbもしくはscFv PPの2倍希釈物と混合することによって、またはビオチン化mAb(450nmにおいて1.0と測定される吸光度をもたらず最適な量のもの)をscFv PPの2倍希釈物と混合することによって、行われた。その混合物(100μl/ウェル)を、96ウェル組織培養プレート(Falcon 3072, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)内においてHMW-MAA<sup>+</sup>細胞(2×10<sup>5</sup>/50μlのRPMI 1640培地)とともに4℃で1時間インキュベートした。標的細胞へのビオチン

40

50

化 s c F v 抗体およびビオチン化 m A b の結合を、報告されているように (Noronhara, J Immunol 161:2968-2976, 1998) SA-HRP および基質との連続的なインキュベーションによって測定した。結果は、HMW-MAA<sup>+</sup>細胞への s c F v または m A b の結合の、m A b、s c F v またはペプチド (競合物質またはインヒビター) によるパーセント阻害として表される。パーセント阻害は、式： $\% \text{阻害} = \left( \frac{\text{インヒビターの非存在下における } OD_{450} - \text{インヒビターの存在下における } OD_{450}}{\text{インヒビターの非存在下における } OD_{450}} \right) \times 100$  を用いて計算した。

#### 【0271】

凍結組織切片およびホルマリン固定組織切片の間接的な免疫ペルオキシダーゼ染色を、以前に報告されているように (Desai, Cancer Res 58:2417-2425, 1998 (本明細書中で参考として援用される)) 行った。

#### 【0272】

##### 間接的な免疫沈降および SDS-PAGE

ツニカマイシン (Sigma Chemical Co.) の存在下における <sup>125</sup>I ヲウ素 (Na<sup>125</sup>I; Amersham) または <sup>35</sup>S メチオニン (トランス-<sup>35</sup>S-標識, ICN Biochemicals, Costa Mesa, CA) による細胞の標識を、報告されているように (Noronhara, J Immunol 161:2968-2976, 1998; Desai, J Immunol 165:3275-3283, 2000) 行った。標識された細胞の可溶化、免疫沈降、SDS-PAGE、オートラジオグラフィおよびフルオログラフィを、ウサギ抗マウス IgG 抗体でコーティングされたプロテイン A の代わりに Gammon Bind+セファロース (Amersham) を使用したことを除いて、報告されているように (Desai, Cancer Res 58:2417-2425, 1998) 行った。

#### 【0273】

##### ビオチン化 s c F v C 2 1 を用いたペプチドライブラリーのパニング

ビオチン化 s c F v C 2 1 を用いた p V I I I ライブラリー X 1 5 および L X - 8 のマイクロパニングを、本質的には報告されているように (Desai, J Immunol 165:3275-3283, 2000 (本明細書中で参考として援用される)) 96 ウェルマイクロタイタープレート (Falcon 3076, Becton Dickinson) において行った。パニングの1回目は、TBS 50 中の  $1 \times 10^{12}$  フェージ粒子および  $1 \mu\text{g}$  / ウェルの濃度のビオチン化 s c F v C 2 1 を用いて行った。その後の3回のパニングは、 $1 \times 10^{10}$  フェージ粒子のフェージ投入および  $0.1 \mu\text{g}$  / ウェルのビオチン化 s c F v C 2 1 を利用して行った。

#### 【0274】

##### フェージディスプレイペプチドライブラリーの免疫学的スクリーニング

s c F v C 2 1 を用いた4回目のパニングの後の X 1 5 および L X - 8 ライブラリーからのランダムフェージクローンを、コロニーを含むプレートからのニトロセルロースフィルターリフトをプローブするために  $10 \mu\text{g} / \text{ml}$  の s c F v 抗体および  $5 \mu\text{g} / \text{ml}$  のビオチン化 m A b 9 E 1 0 を使用することを除いて、報告されているように (Desai, J Immunol 165:3275-3283, 2000 (本明細書中で参考として援用される)) 免疫学的スクリーニングによって解析した。

#### 【0275】

##### フェージディスプレイペプチドの配列解析

フェージクローンのペプチドインサートの配列を、報告されているように (Desai, J Immunol 165:3275-3283, 2000) ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法によって決定した。

#### 【0276】

##### マウスの免疫化

0 日目はプライミングのために等体積のフロイント完全アジュバント、ならびに 2 1、4 2、6 3、8 4 および 1 0 5 日目はブーストのために等体積のフロイント不完全アジュバ

10

20

30

40

50

ントと混合された P 1 C 2 1 ペプチド - K L H 結合体 ( 5 0 μ g / 注射 ) を用いて、 B A L B / c マウス ( 各群 8 匹 ) の皮下に ( s . c . ) 免疫した。プロテアソームサブユニット M B 1 の配列に由来する関連性のないペプチド M B 1 <sub>194-208</sub> で免疫されたマウスをコントロールとして用いた。132日目に、マウスを照射 ( 2 0 K R a d s ) 細胞 ( 5 × 1 0 <sup>5</sup> 細胞 / マウス ) の s . c . 注射によってブーストした。最初の免疫化の1週間前および各免疫化の1週間後にマウスから採血した。

#### 【 0 2 7 7 】

##### フローサイトメトリ解析

s c F v 抗体または免疫血清中の抗体で染色されたメラノーマ細胞のフローサイトメトリ解析を、報告されているように ( W a n g ら、 J I m m u n o l M e t h o d s 2 9 4 : 2 3 - 3 5 , 2 0 0 4 ( 本明細書中で参考として援用される ) ) 行った。簡潔には、細胞 ( 5 × 1 0 <sup>5</sup> ) を、 1 2 . 5 μ l の s c F v P P または 0 . 5 μ g の m A b 9 E 1 0 ( 両方とも、総体積 1 0 0 μ l の 2 % B S A - P B S 中に希釈されたもの ) または 1 0 0 μ l の免疫マウス血清とともに 4 で 1 時間インキュベートした。次いで、細胞を 0 . 5 % B S A - P B S で 2 回洗浄し、最適量のヤギ抗マウス I g 抗体の R P E 標識 F ( a b ' ) <sub>2</sub> フラグメントとともに 4 において 3 0 分間インキュベートした。2 回洗浄した後、細胞を 2 % ホルムアルデヒド中で固定し、 F A C S c a n <sup>T M</sup> フローサイトメーター ( B D B i o s c i e n c e s , S a n J o s e , C A ) を用いて解析した。各サンプルについての凝集物および残骸を排除するために前方散乱ゲートおよび側方散乱ゲートを用いて合計 1 0 , 0 0 0 細胞を数えた。結果は、相対的蛍光強度として表される。

#### 【 0 2 7 8 】

##### 遅延型過敏症 ( D T H ) 反応

ペプチド P 1 C 2 1 またはコントロールペプチドで 6 回免疫されたマウスの右および左の後足蹠に、それぞれ、照射された H M W - M A A <sup>+</sup> 細胞 C o l o 3 8 ( 5 × 1 0 <sup>5</sup> 細胞 / 注射 / ) および H M W - M A A <sup>-</sup> 細胞 L G 2 ( 5 × 1 0 <sup>5</sup> 細胞 / 注射 / ) を 1 3 2 日目に s . c . 注射した。各足蹠の厚さを、以前に報告されているように ( L u o ら、 J I m m u n o l 1 7 4 : 7 1 0 4 - 7 1 1 0 , 2 0 0 5 ( 本明細書中で参考として援用される ) ) 記載の時間において測定し、計算した。

#### 【 0 2 7 9 】

##### 統計解析

試験群において得られた結果間の差の統計的有意性を、スチューデントの t 検定を用いて解析した。

#### 【 0 2 8 0 】

##### s c F v C 2 1 - ペプチド複合体の分子モデル

s c F v C 2 1 の分子モデルを、 A b M ( A c c e l r y s , S a n D i e g o , C A ) を用いて構築した。タンパク質データベース ( B e r n s t e i n ら、 J M o l B i o l 1 1 2 : 5 3 5 - 5 4 2 , 1 9 7 7 ) からのインフルエンザウイルスノイラミニダーゼ ( 1 N M C ) 特異的 s c F v 抗体 ( T u l i p ら、 J M o l B i o l 2 2 7 : 1 4 9 - 1 5 9 , 1 9 9 2 ) およびリゾチーム特異的 s c F v 抗体 ( A y ら、 J M o l B i o l 3 0 1 : 2 3 9 - 2 4 6 , 2 0 0 0 ) の結晶構造を用いて V L - V H 二量体を作製した。CDR を定義する分類およびナンバリングスキームは、 K a b a t ら ( K a b a t ら、 I n S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t 5 : 9 1 , 1 9 9 1 ) に従った。CDR ループの L 1、H 1、L 2 および H 2 は、標準的な正規立体配座 ( c a n o n i c a l c o n f o r m a t i o n ) をとる。H 3 および L 3 は、タンパク質データベース ( I N S I G H T I I , A c c e l r y s ) と C O N G E N ( B r u c c o l e r i ら、 N a t u r e 3 3 5 : 5 6 4 - 5 6 8 , 1 9 8 8 ) のループ検索の両方を用いて構築された。ペプチド P 1 C 2 1 および P 3 C 2 1 の出発立体配座は、 I N S I G H T I I に構築されたループ検索方法を用いて決定された。ペプチド P 1 C 2 1 および P 3 C 2 1 と s c F v C 2 1 との推定上の結合相互作用は、ソフトウェア A U T O D O C K ( M o r r i s ら、 J

10

20

30

40

50

Comput Aided Mol Des 10:293-304, 1996)とINSIGHT IIとDOCK (Des Jarlaisら、J Med Chem 29:2149-2153, 1986)との組み合わせを用いて決定された。

#### 【0281】

動態結合 (Kinetic binding) 研究

結合実験を、表面プラズモン共鳴ベースのバイオセンサー装置BIACORE™ 3000 (Biacore AB, Uppsala, Sweden)を25において用いて行った。センサー表面におけるscFv C21の固定化を、製造者の指示書に従い、標準的なアミンカップリング手順に従って行った。簡潔には、0.2M N-エチル-N'-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)および0.05M N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)を含む35μlの溶液を、5μl/分の流速で注入することにより、センサーチップ表面上のカルボキシル基を活性化させた。scFv C21(40ng/mlの10mM NaOAc緩衝液, pH5.0)を、所望の結合タンパク質レベルに達するまで、20μl/分の流速でそのチップ表面の上に流した。未反応のscFv C21を洗い流し、35μlの1Mエタノールアミンを5μl/分で注入することによって、未反応の活性化された基をブロックした。scFv C21の最終的な固定化応答は、3,000RUだった。参照表面を、同じ条件下であるがscFv C21注入を行わずに同時に作製し、装置および緩衝液アーチファクトについて補正するためのブランクとして使用した。ペプチドを、20~100μl/分の様々な流速において可変濃度で注射した。チップ上に固定化されたscFv C21へのペプチドの結合をリアルタイムでモニターした。SPRから得られる結合定数がアナライトの再結合または大量注入(mass transport)効果に影響されないことを排除するために、様々な流速(20~100μl/分)で研究を反復した。両方の流速において得られた速度定数は、変化しないままだった。

10

20

#### 【0282】

実施例2: scFv C21の単離および特徴づけ

HMW-MAA<sup>+</sup>細胞Colo38を用いた半合成ファージディスプレイscFv抗体ライブラリーのパニングによるscFv抗体の単離

Colo38細胞を用いたパニングによって半合成ファージディスプレイscFv抗体ライブラリーから単離された40種の可溶性scFv抗体の、HMW-MAA<sup>+</sup>細胞Colo38およびHMW-MAA<sup>-</sup>Bリンパ系細胞LG2を用いたELISAにおけるスクリーニングによって、Colo38細胞との選択的な反応性を有する23個のクローンが同定された。その23個のクローンを、Colo38、FF2376線維芽細胞およびT24膀胱癌腫細胞を用いて追加試験することにより、クローンC3、C21、C29およびC30が単離された(これらのすべてが、Colo38細胞との選択的な反応性を示した)。scFv C21が最大の反応性を示したので、さらなる解析のためにscFv C21を選択した。その他のクローンは、失ったので、特徴づけられなかった。

30

#### 【0283】

scFv C21の特異性の解析

異なるHMW-MAA発現を有するヒト細胞株のパネルおよびHMW-MAAホモログを発現するラット神経細胞株B49を用いたELISAにおいて試験したとき、scFv C21は、メラノーマ細胞株Colo38、FO-1、MelurおよびSK-MEL-28だけと反応した。それらのすべてが、HMW-MAAを発現することから、scFv C21が、HMW-MAAに特異的であることが示唆される(図1)。この可能性は、3つの系統の証拠によって立証された。第1に、フローサイトメトリー解析は、scFv C21が、完全長HMW-MAAをコードするプラスミドDNAによる安定なトランスフェクションの後にHMW-MAAを発現するM14細胞を染色したが、HMW-MAAを発現しない親のM14細胞を染色しなかったことを示した(図2)。第2に、scFv C21は、<sup>125</sup>Iで標識されたColo38細胞のHMW-MAA構成要素の特異的な電気泳動(electrophoretic)プロファイルを有する2つの構成要素を

40

50

免疫沈降させた。最後に、連続的な免疫沈降実験において、s c F v C 2 1 は、H M W - M A A 特異的マウス m A b 7 6 3 . 7 4 を用いて免疫除去されていた C o l o 3 8 細胞溶解産物からのいかなる構成要素も免疫沈降させなかった。s c F v C 2 1 が、1 0 0 K D M A A 特異的 m A b 3 7 6 . 9 6 で免疫除去された C o l o 3 8 細胞溶解産物の H M W - M A A 構成要素を免疫沈降させたので、この免疫除去は、特異的である(図3)。逆に、s c F v C 2 1 による C o l o 3 8 細胞溶解産物の免疫除去は、ほとんどを除去したが、すべての構成要素が m A b 7 6 3 . 7 4 によって免疫沈降されたわけではない。これらの結果は、m A b 7 6 3 . 7 4 によって認識されるほとんどであるがすべてではない H M W - M A A 分子上の s c F v C 2 1 によって認識される決定基の発現および/または m A b 7 6 3 . 7 4 の会合定数よりも小さい s c F v C 2 1 の会合定数を反映している。

#### 【0284】

s c F v C 2 1 によって定義される抗原決定基の特徴づけ

N - グリコシル化インヒビターのツニカマイシンの存在下において、<sup>3</sup> <sup>5</sup> S - メチオニンで固有に標識された C o l o 3 8 細胞から免疫沈降された H M W - M A A 構成要素の強度が著しく低下するので、炭水化物が、s c F v C 2 1 によって定義される決定基の発現において役割を果たすと見られる。N - グリコシル化の阻害は、m A b 7 6 3 . 7 4 と反応する 2 2 0 k D 前駆体の蓄積によって示唆される(図4)。競合実験では、s c F v C 2 1 によって定義される決定基と、マウス m A b のパネルによって定義される6つの決定基ならびにヒト s c F v # 2 8、# 6 1 および # 7 0 によって定義される決定基との空間的な関係を調べた。s c F v C 2 1 および m A b V F 1 - T P 3 4 は、メラノーマ細胞 S K - M E L - 2 8 への結合において互いを部分的に阻害した。この阻害は、用量依存的である(図5)。対照的に、マウス m A b 1 4 9 . 5 3、2 2 5 . 2 8、7 6 3 . 7 4、T P 6 1 . 5 および V F 1 - T P 4 1 . 2 ならびに s c F v # 2 8、# 6 1 および # 7 0 は、S K - M E L - 2 8 細胞への s c F v C 2 1 の結合を阻害しなかった。これらの結果から、s c F v C 2 1 によって定義される決定基は、m A b V F 1 - T P 3 4 によって定義される決定基と異なるものであって、それと空間的に近位であり、残りのマウス m A b ならびにヒト s c F v # 2 8、# 6 1 および # 7 0 によって定義される決定基と異なるものであって、それらと空間的に遠位であることが示唆される。

#### 【0285】

s c F v C 2 1 によるメラノサイト病変の免疫組織化学的染色

s c F v C 2 1 は、免疫ペルオキシダーゼ反応において、凍結されたメラノサイト病変を染色したが、ホルマリン固定されたパラフィン包埋メラノサイト病変を染色しなかった。この染色は、膜と細胞質の両方におけるものだった(図6)。s c F v C 2 1 および H M W - M A A 特異的マウス m A b 7 6 3 . 7 4 による良性および悪性のメラノサイト病変の染色パターンの比較から、両方の抗体が、膜および細胞質のパターンで4つの色素性母斑を均一に染色することが示された。さらに、m A b 7 6 3 . 7 4 は、15個中14個の主要な病変を均一なパターンで染色し、s c F v C 2 1 は、9個を均一なパターンで染色し、2個を不均一なパターンで染色した。この染色は、1つの病変において膜におけるものであり、4つでは膜および細胞質におけるものであり、6つでは細胞質におけるものだった。最後に、m A b 7 6 3 . 7 4 は、6つの転移性病変を均一なパターンで染色し、s c F v C 2 1 は、3つを均一なパターンで、3つを不均一なパターンで染色した。この染色は、3つの病変において膜および細胞質におけるものであり、残りの3つでは細胞質におけるものだった。

#### 【0286】

実施例3：s c F v C 2 1 のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列

s c F v C 2 1 のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を標準的な方法に従って決定した。V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub> およびリンカーのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を以下に提供する。免疫グロブリン重鎖のヒンジ、C H 2 および C H 3 ドメインのヌクレオチド配列も提供する。

10

20

30

40

50

【 0 2 8 7 】

【 化 3 】

ヌクレオチド配列

V<sub>H</sub> (配列番号1)

ATGCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGT  
CCTCGGTGAAGGTCTCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATG  
CTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG  
AGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAG  
GGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGG  
AGCTGAGCAGCCTGCGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAG  
GGCCCTTGATCCTATTACGTTTGACTCCTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCA  
CCGTCTCGAGA

10

リンカー (配列番号2)

GGTGGAGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG

V<sub>L</sub> (配列番号3)

TCTGAGCTGACTCAGGACCCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGT  
CAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGG  
TACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTGTACTTGTTCATCTATGGTAAAA  
ACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGG  
AAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCT

20

【 0 2 8 8 】

## 【化 4】

GACTATTACTGTAACCTCCCGGGACAGCAGTGGTAACCATGTGGTATTTCG  
GCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTAGATCT

## 重鎖(Hc)ヒンジ + CH2 + CH3 (配列番号4)

GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCGTGCCAGCAC  
CTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTTCCCCC AAAACCCAAG  
GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGG  
ACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG  
CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA  
CAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCCCTACCGTCCCTGCACCAGGACTGG  
CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAAGCCCTCCAG  
CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAAGCCAAAAGGGCAGCCCCGAGAACC  
ACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAG  
GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT  
GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCC  
TCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCG  
TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT  
GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT  
CCGGGCAAATGA

10

## アミノ酸配列

20

V<sub>H</sub> (配列番号5)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG  
IPIFGTANYAQKFKQGRVTTTADESTSTAYMELSSLRSDDTAVYYCARALDPI  
TFDSWGQGTLVTVSR (118アミノ酸)

V<sub>L</sub> (配列番号6)

SELTQDPAVSVVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVTVIYGKNN  
RPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTK  
LTVLGRS (110アミノ酸)

30

V<sub>H</sub> (配列番号5) と V<sub>L</sub> (配列番号6) の両方について、フレームワーク領域 (FR) および CDR の位置は、以下のとおりである :

FR 1 - アミノ酸 1 ~ 26

CDR 1 - アミノ酸 27 ~ 38

FR 2 - アミノ酸 39 ~ 55

CDR 2 - アミノ酸 56 ~ 65

FR 3 - アミノ酸 66 ~ 104

CDR 3 - アミノ酸 105 ~ 115 (V<sub>H</sub>) または 105 ~ 110 (V<sub>L</sub>)

実施例 4 : scFv ペプチド模倣物の同定および特徴づけ

ファージディスプレイペプチドライブラリー L X - 8 および X 15 から単離された scFv C 2 1 に結合するペプチドの配列

40

免疫学的スクリーニングから、scFv C 2 1 が、ファージディスプレイペプチド X 15 ライブラリーからのパニングによって単離されたクローンの 20% と強く反応するが、L X - 8 ライブラリーから単離されたクローンのいずれとも反応しないことが明らかになった。免疫スクリーニングから得られた陽性クローンのファージ上清は、ELISA においても scFv C 2 1 と反応した。これらのクローンが、無関係な MAA を認識する scFv F 9 8 および W 3 4 と反応しなかったため、この反応性は、特異的である。scFv C 2 1 と反応するクローンのうちの 16 のヌクレオチド配列解析から、解析された 16 クローンの 88、6 および 6% においてそれぞれ配列 S P S W Y C P D C D K R P L V (P 1 C 2 1) (配列番号 7)、E A R N W H D F P I H P R T L (P 2 C 2 1) (配列番

50

号8)およびR P Y R Y D P L G D L K S R H ( P 3 C 2 1 ) ( 配列番号10 ) が同定された。ペプチドP 1 C 2 1およびP 3 C 2 1の配列は、コンセンサス

【0289】

【化5】

### PXXYXPXXD(配列番号9)

を共有するが、ペプチドP 2 C 2 1の配列は、完全に異なるものである。s c F v C 2 1によって認識される決定基の炭水化物の性質と一致して、ファージディスプレイペプチドライブラリーから単離された3つのペプチドの配列と公開されているHMW - M A A コアタンパク質のアミノ酸配列 ( P l u s c h k e r s , P r o c N a t l A c a d S c i U S A 9 3 : 9 7 1 0 - 9 7 1 5 , 1 9 9 6 ) との間に相同性は、見出されなかった。

【0290】

s c F v C 2 1に対する合成ペプチドの反応性の解析

s c F v C 2 1に対するファージディスプレイペプチドの反応性を確認するために、ペプチドP 1 C 2 1 ( 環状 )、P 2 C 2 1 ( 線状 ) およびP 3 C 2 1 ( 線状 ) を合成し、E L I S A においてs c F v C 2 1と反応する能力および阻害アッセイにおいてHMW - M A A + メラノーマ細胞C o l o 3 8 への結合を阻害する能力について試験した。0 . 2 5 % グルタルアルデヒドP B S によってマイクロタイタープレート上に固定化された合成ペプチドP 1 C 2 1 およびP 2 C 2 1 は、E L I S A においてs c F v C 2 1 と特異的に反応したが、固定化された合成ペプチドP 3 C 2 1 は、反応しなかった ( 図7 )。ペプチドが無関係なHMW - M A A 特異的s c F v # 2 8 と反応しなかったため、この結合は、特異的である。さらに、ペプチドP 1 C 2 1 およびP 3 C 2 1 は、用量依存的様式でHMW - M A A + 細胞へのs c F v C 2 1 の結合を阻害した ( 図8 )。この両方のペプチドが、メラノーマ細胞C o l o 3 8 へのs c F v # 2 8 の結合を阻害しなかったため、この阻害は、特異的である ( 図8 )。対照的に、P 2 C 2 1 は、メラノーマ細胞C o l o 3 8 へのs c F v C 2 1 の結合を阻害しなかった。可溶性ペプチドP 3 C 2 1 によってメラノーマ細胞へのs c F v C 2 1 の結合が阻害されること、および固定化されたペプチドP 3 C 2 1 とs c F v C 2 1 との反応性がないことは、このペプチドとs c F v C 2 1 との結合が、立体構造的に感受性であることを示唆する。

【0291】

B A L B / c マウスにおけるペプチドP 1 C 2 1 によるHMW - M A A 特異的な体液性免疫および細胞性免疫の誘導

ペプチドP 1 C 2 1 によるHMW - M A A 模倣をさらに立証するために、B A L B / c マウスにおいてHMW - M A A 特異的な体液性免疫および細胞性免疫を誘発する能力を試験した。HMW - M A A + メラノーマ細胞C o l o 3 8 と選択的に反応する抗体が、ペプチドP 1 C 2 1 による3回目の免疫の1週間後にB A L B / c マウスから回収された血清中で検出された。これらの抗体の平均力価は、低かったが、無関係なM B 1 1 9 4 - 2 0 8。ペプチドで免疫されたマウス由来の血清中のこれらの抗体の平均力価よりも有意に ( p < 0 . 0 5 ) 高かった。さらに、メラノーマ細胞と反応する抗体の力価は、3回のさらなる追加免疫の後も変化しなかった。しかしながら、HMW - M A A + メラノーマ細胞と選択的に反応する抗体の力価は、ペプチドP 1 C 2 1 で免疫されたマウスを、HMW - M A A + メラノーマ細胞でブーストすることによって著しく増加した ( 図9 )。

【0292】

2つの系統の証拠が、誘発された抗体のHMW - M A A 特異性を立証した。第1に、この免疫血清は、完全長HMW - M A A をコードするプラスミドDNAによるトランスフェクション後にHMW - M A A を発現するM 1 4 # 5 / HMW - M A A 細胞を染色したが、親のM 1 4 # 5 細胞を染色しなかった ( 図10 )。後者の細胞は、HMW - M A A を発現しない。対照的に、ペプチドM B 1 1 9 4 - 2 0 8 で免疫されたマウス由来の血清は、C o l o 3 8 細胞との反応性を示さなかったが、それらは、その免疫ペプチドと高度に反応

10

20

30

40

50

した。第2に、SDS-PAGE解析から、ペプチドP1C21およびColo38細胞で連続的に免疫されたマウス由来の血清が、Colo38細胞溶解産物由来の特徴的なHMW-MAA成分を免疫沈降させたことが示された。ペプチドP1C21およびHMW-MAA<sup>+</sup>細胞Colo38を用いたプライム・ブーストストラテジーによって誘発された免疫応答の特異性は、(i)ペプチドP1C21およびHMW-MAA<sup>-</sup>リンパ系細胞LG2または(ii)ペプチドMB1<sub>194-208</sub>およびHMW-MAA<sup>+</sup>細胞Colo38で免疫されたBALB/cマウス由来の血清のHMW-MAA<sup>+</sup>細胞Colo38との選択的な反応性の欠如によって示唆される(両方が、結合アッセイおよび免疫沈降実験において)(図11)。

#### 【0293】

LG2細胞を注射した足蹠よりもColo38細胞を注射した足蹠が有意に( $p < 0.05$ )強く腫脹したことによって示されるように、ペプチドP1C21でBALB/cマウスを免疫することによってHMW-MAA<sup>+</sup>細胞Colo38に対するDTH応答が誘発された。この腫脹は、48時間持続した。無関係のMB1<sub>194-208</sub>ペプチドで免疫され、Colo38細胞を負荷されたマウスの足蹠では腫脹が認められなかったので、ペプチドP1C21によって誘導されるHMW-MAA<sup>+</sup>メラノーマ細胞に対するDTH応答は、特異的である(図12)。

#### 【0294】

s c F v C 2 1 へのペプチドP1C21およびP3C21の結合の構造的根拠

s c F v C 2 1 へのペプチドP1C21およびP3C21の結合に対する構造的根拠を定義するために、s c F v C 2 1 およびこれら2つのペプチドとの複合体の分子モデルを構築した。INSIGHT IIにおける限られた立体配座検索アルゴリズムを用いて、ペプチドP1C21およびP3C21の最初のモデルを構築した。s c F v C 2 1 へのペプチド結合の最初の配向をDOCK解析によって決定した。最善の配向を、接触スコアならびに結合エネルギーに基づいて選択し、次いで最適な結合および相互作用を解析するためにINSIGHT IIを用いて最小化した(表1)。その最小化中、最初の2000サイクルについてはs c F v C 2 1 を固定したままにした。続いて、CDRループおよびペプチドを動かした。

#### 【0295】

10

20

【表 1】

表1. ペプチドP1C21およびP3C21とscFvC21との分子間接触および各複合体の計算された結合エネルギー

リガンド	scFv C21接触部分	総エネルギー (Kcal/mol)
P1C21 (Ser2)	H30, H31, H100	-93.8
P1C21 (Pro 7)	L92	
P1C21 (Asp 8)	L91, L30	
P1C21 (Lys 11)	H51, H57, H58	
P1C21 (Arg 12)	H32, H98, H99, H101	
P1C21 (Pro 13)	H53, H54	
P1C21 (Leu 14)	H29	
P3C21(Pro 2)	H28, H53	-7.3
P3C21(Tyr 3)	H30	
P3C21(Arg 4)	H26, H27, H31	
P3C21(Tyr 5)	H29	
P3C21(Pro 7)	H99, H100	
P3C21(Leu 11)	L30, L48	
P3C21(Lys 12)	L50, L51	
P3C21(Arg 14)	L29, L49, L64, L66	
P3S10(Pro 2)	H28, H53	-16.4
P3S10(Tyr 3)	H30	
P3S10(Arg 4)	H26, H27, H31	
P3S10(Tyr 5)	H29	
P3S10(Pro 7)	H99	
P3S10(Leu 8)	<b>H100</b>	
P3S10(Ser 10)	<b>L47</b>	
P3S10(Leu 11)	L30, L48, L89	
P3S10(Lys 12)	L50, L51	
P3S10(Arg 14)	L29, L49, L64, L66	

10

20

30

40

50

ペプチドP1C21およびP3C21の結合様式の立体配座の分子モデリングから、これらのペプチドが、scFvC21の抗原結合部位内の様々な官能基と相互作用し得ることが示唆される。10 Aspから10 Serへの置換は、線状のペプチド型の結合を改善することを示唆する。太字で示されている残基は、10 Aspから10 Serへの変異に起因してさらに好ましい接触部分である。

## 【0296】

ペプチドP1C21およびP3C21の1次配列は、50%相同である。5 Tyr、7 Proおよび10 Aspが、両方の配列の中心において保存されている。この分子モデリングにおいて、両方のペプチドが、保存された残基を介して2方向でscFvC21と相互作用する(表1および図13)。ペプチドP1C21は、折り畳まれた構造をとり、scFvC21の重鎖および軽鎖CDR3を横断して結合するが、ペプチドP3C21は、伸びた立体配座で、すべてのCDRループを横断して結合する。P1C21は、環状ペプチドであり、その折り畳まれた構造によってscFvC21とのいくつかの好ましい相互

作用がもたらされ、その構造は、重鎖 C D R 2 および C D R 3 ならびに軽鎖 C D R 2 によって形成される疎水性ポケットにドッキングする 4 位の T r p に起因して、より安定な複合体を形成する (表 1)。他方、線状ペプチドの P 3 C 2 1 は、T y r との接触部分がより少なく、P r o によって媒介される主に疎水性の相互作用によって安定な複合体を形成する。保存された 1 0 A s p は、いかなる接触部分にも関与しない。

【 0 2 9 7 】

s c F v C 2 1 に対するペプチド P 3 C 2 1 の反応性に対するアミノ酸置換の影響

起きうる構造遷移および潜在的な接触残基と関連する影響をさらに特徴づけるために、分子モデリング研究に基づいてアミノ酸置換を線状ペプチド P 3 C 2 1 に導入した。ペプチド P 3 C 2 1 と s c F v C 2 1 との反応性に対する選択された置換の影響を、B i a c o r e (表 2) および阻害解析 (図 8) によって実験的に試験した。

10

【 0 2 9 8 】

【表 2】

表 2. scFvC21 へのペプチド P1C21 および P3C21 の結合の動態結合解析

ペプチド	$K_{on}$ (1/Ms)	$K_{off}$ (1/s)	$K_d$ (M)
P1C21 SPSWYCPDCDKRPLV (配列番号 7)	1.183e3	9.7e-3	8.24e-6
P3C21 RPYRYDPLGDLKSRH (配列番号 10)	2.17e3	6.55e-2	3.02e-5
P3A5 RPYRADPLGDLKSRH (配列番号 11)	検出可能な結合は観察されない		
P3V7 RPYRYDVLGDLKSRH (配列番号 12)	検出可能な結合は観察されない		
P3S10 RPYRYDPLGSLKSRH (配列番号 13)	9.17e2	3.07e-3	3.34e-6

20

30

結合を評価するために、1~32  $\mu$  M の範囲の濃度でペプチド P1C21 および P3C21 を注入した。得られたセンサーグラム (sensograms) を、1:1 Langmurian 相互作用モデルへの全体的適合による速度定数 ( $k_{on}$  および  $k_{off}$ ) の推定のために使用した。結合定数 ( $K_d$ ) は、 $k_{off}/k_{on}$  比として各ペプチドについて計算された。

s c F v C 2 1 - P 3 C 2 1 複合体において、5 T y r の (H 2 9 に対する) 相互作用が、7 P r o を疎水性ポケットに固着させるために重要であったことから、これらの 2 つの重要な位置における置換は、s c F v C 2 1 の結合を取り消しうることを示唆される。結合特性に対するそのペプチド配列に導入された変更の影響を試験するために、これらのペプチドと固定化された s c F v C 2 1 との相互作用の B i a c o r e 解析が行われた (表 2)。実験データを計算された曲線にうまく当てはめられたことから、これらのペプチドと s c F v C 2 1 との単純な擬一次 (p s e u d o - f i r s t o r d e r) 相互作用が示唆される。5 T y r 位および 7 P r o 位における置換残基は、s c F v C 2 1 へのペプチド結合を実際に取り消した (表 2)。

40

【 0 2 9 9 】

5 T y r 位および 7 P r o 位とは対照的に、1 0 A s p は、s c F v C 2 1 とのいかなる接触部分にも含まれなかった。しかしながら、シミュレーション中、本発明者らは、L G D L 配列域が非常に可動性であるのに対し、1 0 A s p が s c F v C 2 1 結合部位と接触することが多い (L 8 9 A r g) が、この配向は、両方の L e u 残基を露出させること

50

に気づいた。疎水性残基が露出される配向は、エネルギー的に適当でないので、本発明者らは、さらなる最小化のために最も好ましい結合様式の1つとして露出された10 Asp 立体配座を選択したが、10位にSer残基を導入した。Ser置換ペプチドは、Aspとは対照的に、Leu配向を大きく変化させることなくscFvC21の49LeuにおいてTyrと接触する。分子間相互作用の解析により、このSer置換ペプチドがscFvC21とより効率的に結合し得ることが示唆された(表1)。この可能性は、scFvC21と置換ペプチドとの相互作用のBiacore解析によっても確認された(表2)。10位におけるSerによるAspの置換(P3S10)は、P3C21がColo38細胞に対するscFvC21の反応性を阻害する能力に対してほんのわずかな影響しか有しなかった(図8)。この知見から、10位において極性置換が許容されることが示唆される。阻害の低下は、HMW-MAA-scFvC21-ペプチドの相互作用の複雑な性質に起因し得る。

10

#### 【0300】

実施例5：癌を処置するためのHMW-MAA特異的モノクローナル抗体

この実施例では、HMW-MAAの過剰発現を示す癌(本明細書中で「HMW-MAA陽性」癌とも呼ばれる)(メラノーマ、乳癌、前立腺癌および扁平上皮癌腫を含むがこれらに限定されない)を処置するためのHMW-MAA特異的ヒトモノクローナル抗体の使用が説明される。HMW-MAA陽性癌と診断された患者は、当該分野において標準的な手順に従って処置され得る。一般に、処置の選択肢としては、外科術、放射線治療、化学療法、免疫療法またはインターフェロン療法が挙げられる。

20

#### 【0301】

この実施例では、HMW-MAA陽性メラノーマと診断された患者に、Pseudomonas外毒素(PE)に連結されたHMW-MAA特異的ヒトモノクローナル抗体を含む免疫結合体を投与する。PE免疫結合体の調製法は、報告されている(例えば、米国特許第7,081,518号および米国付与前公開(U.S.Pre-Grant Publication)番号2005/0214304(これらは本明細書中で参考として援用される)を参照のこと)。一部の患者において、この免疫結合体は、静脈内ボラス注射によって1日おきに合計3~6回投与される。他の患者では、この免疫結合体は、10日間にわたって連続的な静脈内点滴によって投与される。患者に投与される免疫結合体の用量は、患者の体重および性別、ならびに投与の様式および時間経過に応じて変化する。処置後、癌の進行(腫瘍の成長および転移を含む)および疾病の他の臨床的徴候について患者を評価する。患者は、この免疫結合体単独で、または1つ以上の標準的な癌処置法と併用して、処置され得る。例えば、メラノーマを除去する外科術を受けた患者が、その後、この免疫結合体で処置され得る。

30

#### 【0302】

実施例6：さらなる材料および方法

マウス：雌SCID/BALB/cマウス(C.B-Igh-1<sup>b</sup>IcrTac-Prkdcscid, 6~8週齢)は、NCIまたはTaconic Farms, Incから購入した。本研究のための実験は、Institutional Animal Care and Use Committeeによって承認されたものである。

40

#### 【0303】

細胞株：ヒト腫瘍細胞株を、10%FCSが補充されたRPMI1640培地中で維持した。

#### 【0304】

抗体：scFv-FcC21、およびアイソタイプコントロールとして使用されるscFv-Fc119を、マウス腹水から連続的な硫酸塩析およびカプリル酸沈殿ならびにプロテインAカラムによって精製した。PE-抗ヒトIgG抗体は、Jackson ImmunoResearch Laboratories, Incから購入した。シグナル伝達分子に対する特異的抗体：PKC(Sigma);FAKおよびリン酸化FAK(Tyr397)(BD Bioscience);PDKおよびリン酸化PDK1(se

50

r 2 4 1)、Aktおよびリン酸化Akt (Ser 473)、リン酸化Src (Tyr 416)、Erk1/2およびリン酸化44/42 Erk1/2 (Thr 202/Tyr 204)、抗-カテニンならびにリン酸化ヒストンH3 (Ser 10) (Cell signaling technology)を商業的に購入した。

【0305】

免疫組織化学, ホスホ-ヒストンH3 (Ser 10): 製造者のプロトコルに従って、肺切片のFFPEを抗p-ヒストン3抗体で染色した。

【0306】

フローサイトメトリー解析: 培養細胞株からの腫瘍細胞調製物を、CSPG4特異的scFv-FcC21で30分間染色し、PBSで2回洗浄し、そしてPE標識抗ヒトIgG抗体とともに30分間インキュベートした。3回洗浄した後、細胞をフローサイトメトリーで解析した。scFv-Fc119をアイソタイプコントロールとして使用した。

【0307】

ウエスタンブロッティング: シグナル伝達関連タンパク質に対するウエスタンブロットアッセイを、以下: i) 72時間にわたって血清飢餓にされ、さらに48時間にわたってscFv-FcC21 (50 µg/ml)、アイソタイプマッチコントロール (50 µg/ml) またはPBSとともにインキュベートされ、そして溶解緩衝液 (10 mM Tris-HCl、1% NP40、1 mM EDTA、0.1% BSA、150 mM NaCl、1/50のプロテアーゼインヒビターカクテル (Calbiochem) 中で溶解された、培養MV3細胞 (96ウェルプレートにおいて $2 \times 10^4$ 細胞/ウェル); および ii) 外科的に取り出され急凍され、1/50のプロテアーゼインヒビターカクテル (Calbiochem) を含む氷冷RIPA緩衝液 (Thermo Scientific) を加える前後にホモジナイズされた異種移植片から調製された溶解産物に対して標準的な手法を用いて行った。60秒間ボルテックスした後、サンプルを45分間氷冷した。4、13,000 rpmで30分間、遠心分離することによって不溶性材料を組織溶解産物から除去した。タンパク質濃度をBradford試薬 (Bio-Rad) によって測定した。等量の清澄化溶解産物タンパク質をドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、0.45 µm (ポアサイズ) PVDF (Millipore) 上に転写した。膜を、室温において2時間、5%脱脂粉乳+2%BSAでブロッキングした後、抗PKC、抗リン酸化FAK、抗FAK、抗PDK、抗リン酸化PDK1 (Ser 241)、抗リン酸化Akt、抗Akt、抗リン酸化Src (Tyr 416)、抗-Erk1/2、抗リン酸化Erk1/2 (Thr 202/Tyr 204)、抗-カテニンおよびHLAクラスI抗体HC-10 (0.2 µg/ml) または抗(anto)カルネキシンmAb To5 (0.2 µg/ml) を用いて4において一晚、次いで二次抗体を用いてプロービングした。バンドを、Enhanced Chemiluminescence System (GE Life Science) を用いて可視化し、バンドの密度をFOTO/ANALYST (登録商標) Investigator Eclipseシステム (Fotodyne Incorporate) で読み出し、TOTAL LAB™ TL100ソフトウェア (Nonlinear Dynamics) を用いて定量化した。HLAクラスIまたはカルネキシンを充填コントロールとして使用した。

【0308】

細胞の成長および遊走: 細胞成長アッセイについては、細胞 ( $5 \times 10^4$  / ウェル) を48時間血清飢餓にし、次いで、無血清RPMI 1640培地中に4倍希釈のMATRIGEL™ (低成長因子型 (growth factor-reduced) MATRIGEL™ - CB-40230, BD Biosciences) およびscFv-FcC21 (0.5 mg/ml)、コントロールscFv-Fc119 (0.5 mg/ml) またはPBSを含む96ウェルプレート (総体積200 µl / ウェル) に播種し、37、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気において6日間培養した。遊走アッセイについては、細胞 ( $5 \times 10^4$  / ウェル) を、48時間血清飢餓にし、次いで、scFv-FcC21 (0.5 mg/ml)、コントロールscFv-Fc119 (0.5 mg/ml) またはPBSを含む2

10

20

30

40

50

4トランスウェルプレート(24ウェルインサート,ポアサイズ8 $\mu$ m;BD Biosciences)に播種した。細胞は、10 $\mu$ g/mlフィブロネクチンを含む無血清RPMI1640培地に向かって遊走した。48時間後、遊走した細胞をHEMA3染色セットで染色し、写真撮影し、Zeiss Inverted Fluorescence Microscope(AxioVision Software)下で計数した。独立した6つの高倍率視野(200 $\times$ )の平均を棒グラフで示す。上記のすべての実験を3つ組で行った。

#### 【0309】

実験的肺転移および抗体投与：図16に示されているように、SCIDマウスにMV3細胞を静脈内注射し、scFc-FcC21で処置した。

10

#### 【0310】

自然肺転移および処置実験：MV3細胞をSCIDマウスの皮下に埋め込んだ。ケタミン(5mg/kg,腹腔内(i.p.))および連続的なイソフルラン吸入を用いて、そのマウスを完全に麻酔しながら、原発腫瘍を外科的に取り出した。外科術後、そのマウスに鎮痛薬のケトプロフェン(5mg/kg,皮下(subcutaneous)(s.c.))投与)を3日間にわたって毎日投与した。図18に示されているように、scFc-FcC21を投与した。

#### 【0311】

実施例7：ヒト腫瘍細胞株のパネルに対するscFv-FcC21の反応性

フロー解析から、scFv-FcC21が、メラノーマ細胞株MDA-MB-435、MV3およびWM1158；神経膠腫細胞株LN444およびA1207ならびに頭頸部癌細胞株PCI30およびPCI13を含むヒト培養細胞株のパネルの細胞表面を特異的に染色したことが示されている。CSPG4-メラノーマ細胞株M14をネガティブコントロールとして用い、M14細胞株のCSPG4トランスフェクタントであるM14/CSPG4をポジティブコントロールとして用いた(図14~15を参照のこと)。

20

#### 【0312】

実施例8：腫瘍細胞の成長および遊走のscFv-FcC21による阻害

scFv-FcC21は、腫瘍細胞の成長および遊走をインビトロにおいて阻害した(図22~23)。この方法は、上記の実施例6に記載されている。

#### 【0313】

実施例9：腫瘍細胞の成長、生存および転移にとって重要な複数のシグナル伝達経路のインビトロにおける阻害

30

scFv-FcC21で処理されたMV3細胞は、低レベルのタンパク質キナーゼCアルファ(PKC)およびFAKを有した。さらに、scFv-FcC21処置により、FAK、Erk1/2、PDK1(Aktの上流)およびAktのリン酸化/活性化が阻害された。Akt活性化の低下は、PI3K/Aktシグナル伝達経路の負の制御因子であるリン酸化/活性化PTENの増加を伴った(図24~26を参照のこと)。

#### 【0314】

実施例10：ヒトメラノーマの確立された実験的転移のscFc-FcC21によるインビボにおける阻害

40

scFc-FcC21は、MV3細胞の実験的転移を有意に阻害した(図16)。代用マーカーのp-ヒストンH3を用いて腫瘍細胞の増殖速度についても転移性病変を評価した。scFc-FcC21の処置により、有糸分裂細胞の数が有意に減少した(図17)。

#### 【0315】

実施例11：外科術後のヒトメラノーマの再発および自然転移のscFc-FcC21によるインビボにおける阻害

scFc-FcC21がSCIDマウスにおいてMV3腫瘍の腫瘍再発および自然転移を阻害する能力を、原発腫瘍の外科的除去後に試験した。scFc-FcC21で処置されたマウスは、コントロールscFv-Fcを投与されたマウスよりも有意に遅い速度の

50

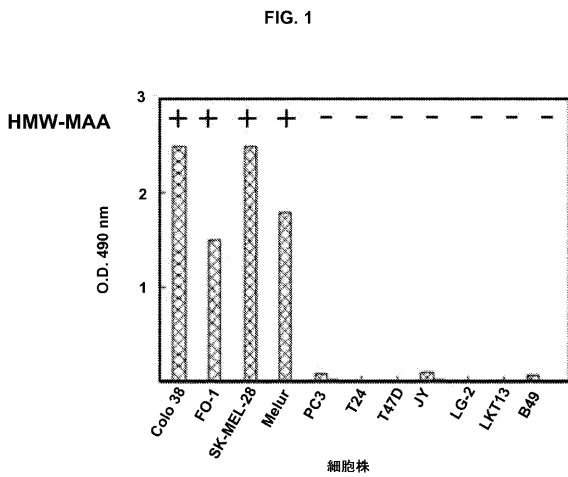
腫瘍再発および低いレベルの自然肺転移を有した（図18～20）。さらに、scFv-FcC21で処置されたマウスから外科的に取り出された原発腫瘍を、メラノーマの成長および進行に関連する特異的シグナル伝達経路の活性化についても評価した。PKC-およびSrcシグナル伝達経路の活性化は、コントロールscFv-Fc119で処置されたマウスから取り出された原発腫瘍と比べて、scFv-FcC21で処置されたマウスから取り出された原発腫瘍において著しく低下した（図21）。

【0316】

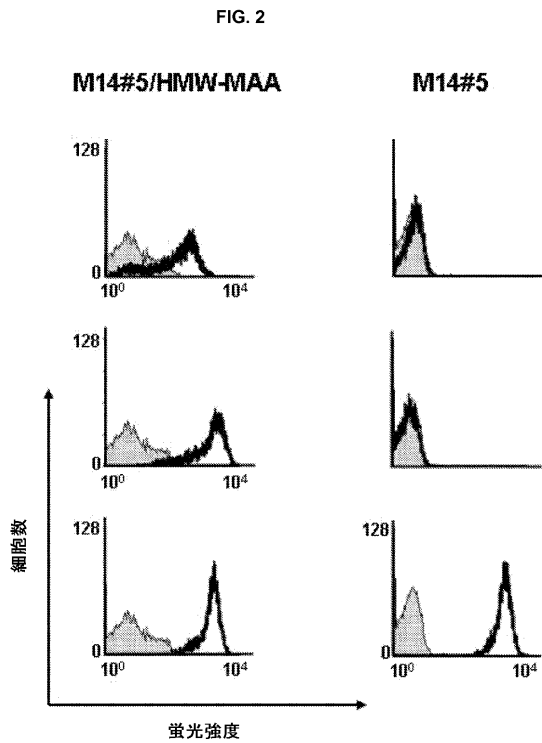
本開示は、HMW-MAAに特異的な完全ヒト抗体を提供する。本開示は、さらに、HMW-MAAの発現に関連する癌を処置するかまたは検出する方法およびこれらの抗体を用いて処置する方法を提供する。記載した方法の正確な詳細が、記載した開示の精神から逸脱することなく変更され得るかまたは改変され得ることは、明らかである。本発明者らは、以下の請求項の範囲および精神に含まれるそのようなすべての改変およびバリエーションを特許請求する。

10

【図1】

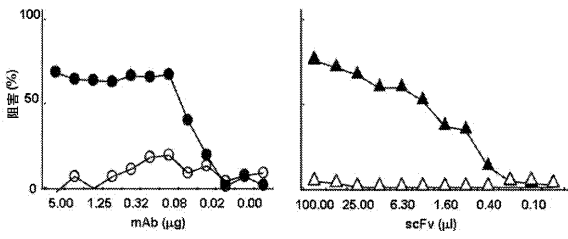


【図2】



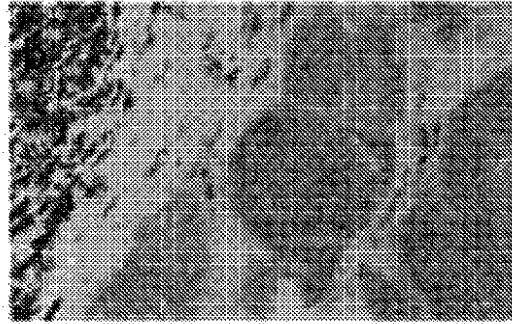
【 図 5 】

FIG. 5



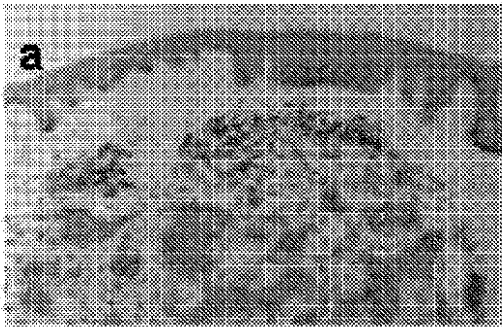
【 図 6 B 】

FIG. 6B



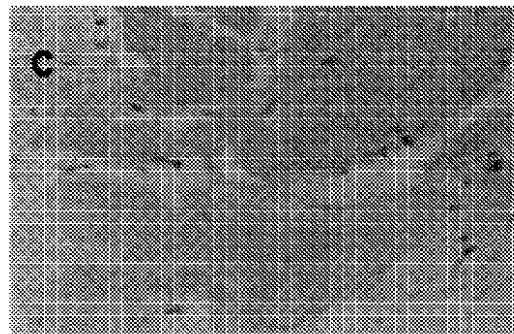
【 図 6 A 】

FIG. 6A



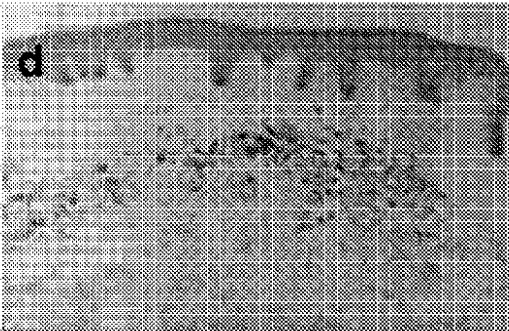
【 図 6 C 】

FIG. 6C



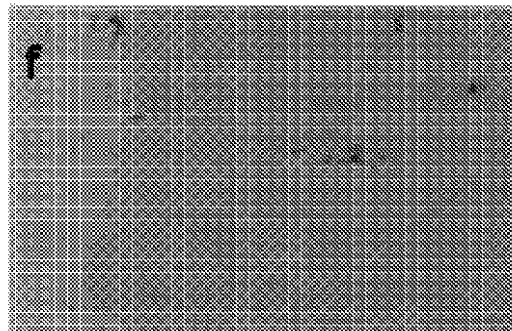
【 図 6 D 】

FIG. 6D



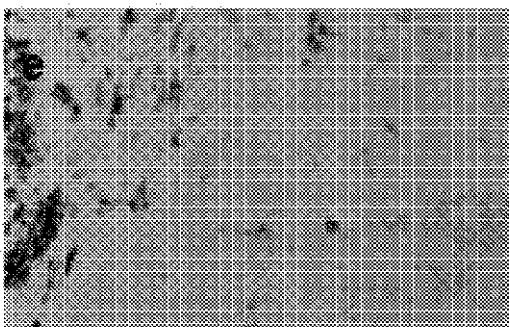
【 図 6 F 】

FIG. 6F



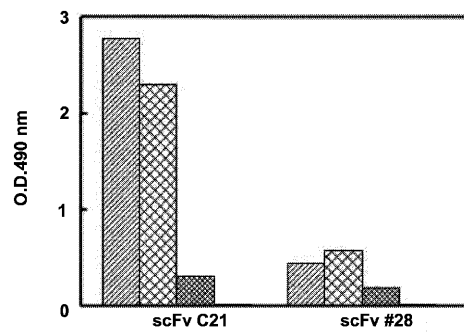
【 図 6 E 】

FIG. 6E



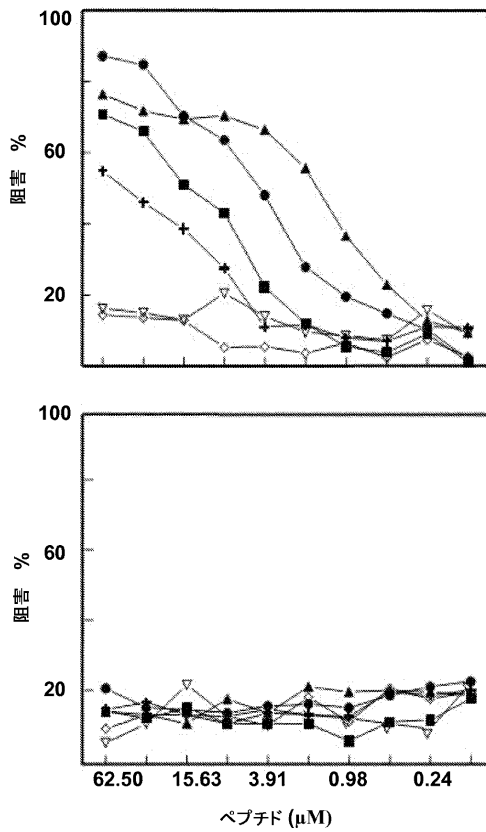
【 図 7 】

FIG. 7



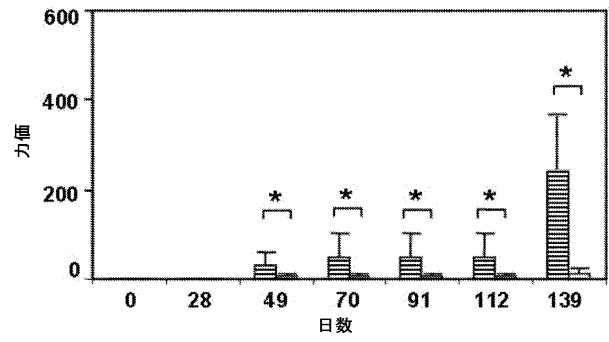
【 図 8 】

FIG. 8



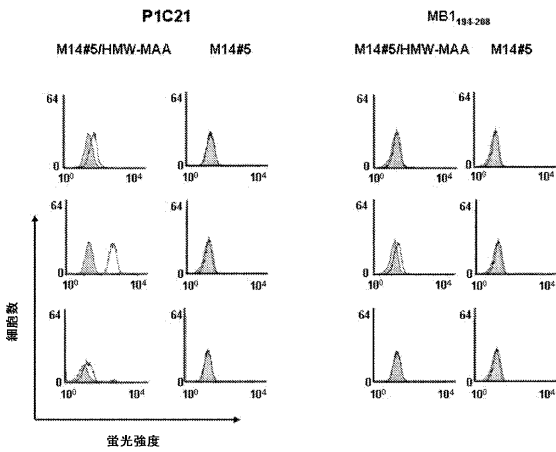
【 図 9 】

FIG. 9



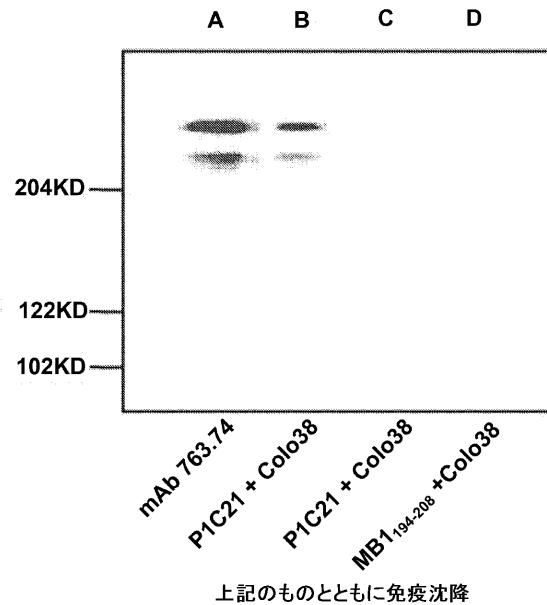
【 図 1 0 】

FIG. 10

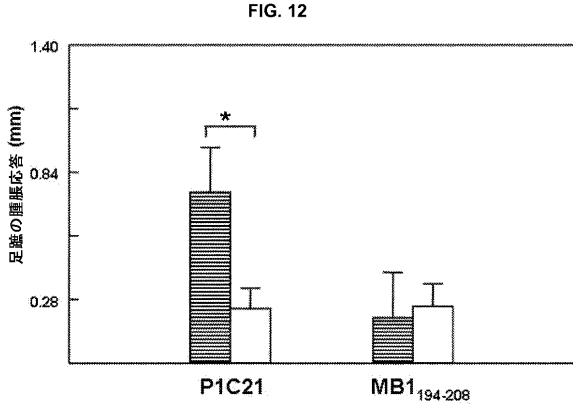


【 図 1 1 】

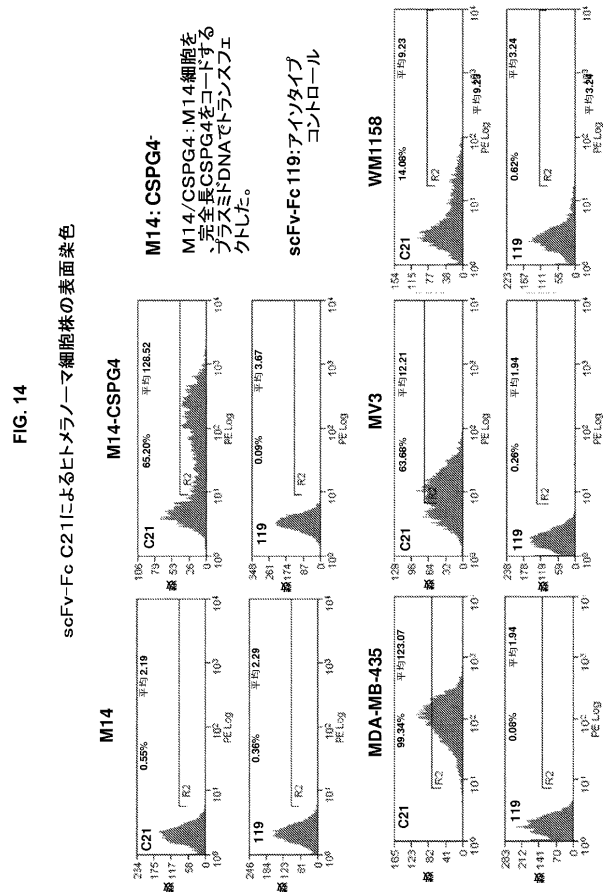
FIG. 11



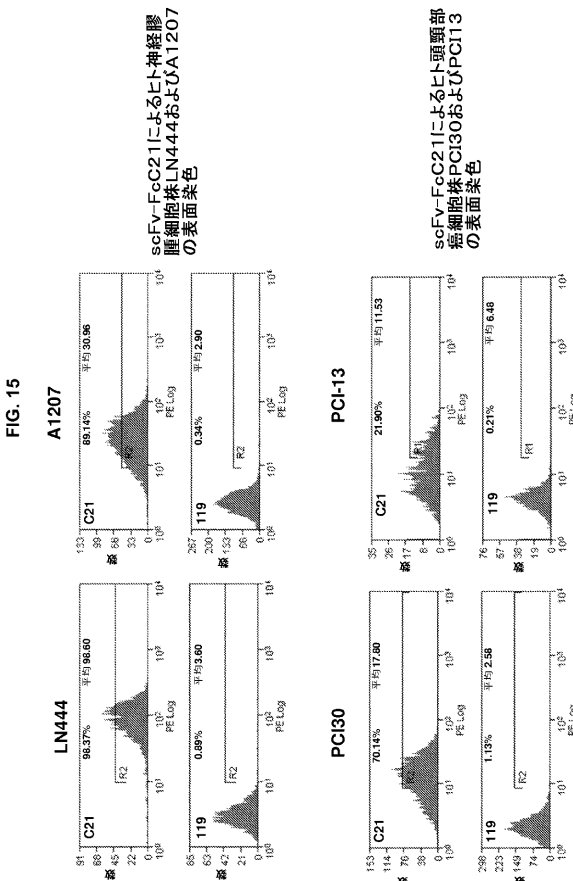
【 図 1 2 】



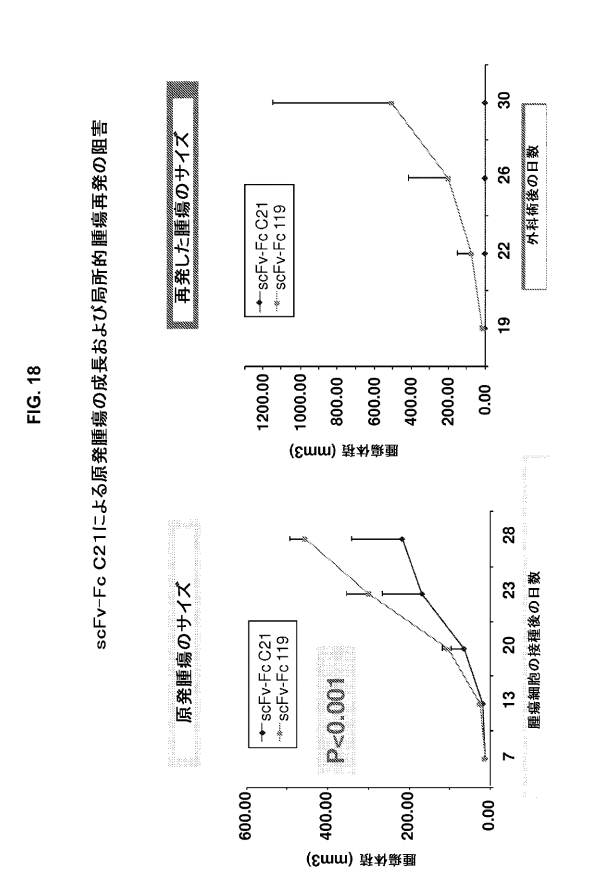
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



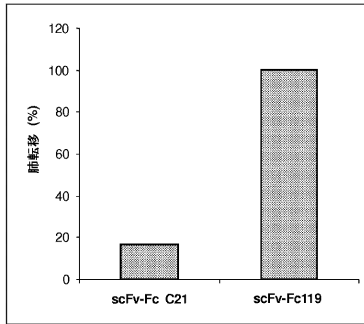
【 図 1 8 】



【 図 2 0 】

FIG. 20

scFv-FcC21によるマウスにおける外科術後の自然肺転移の阻害

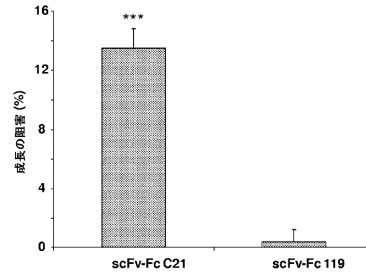


肺転移は:  
C21で処置された1/6匹のマウス  
119で処置された6/6匹のマウス  
において見られた

【 図 2 3 】

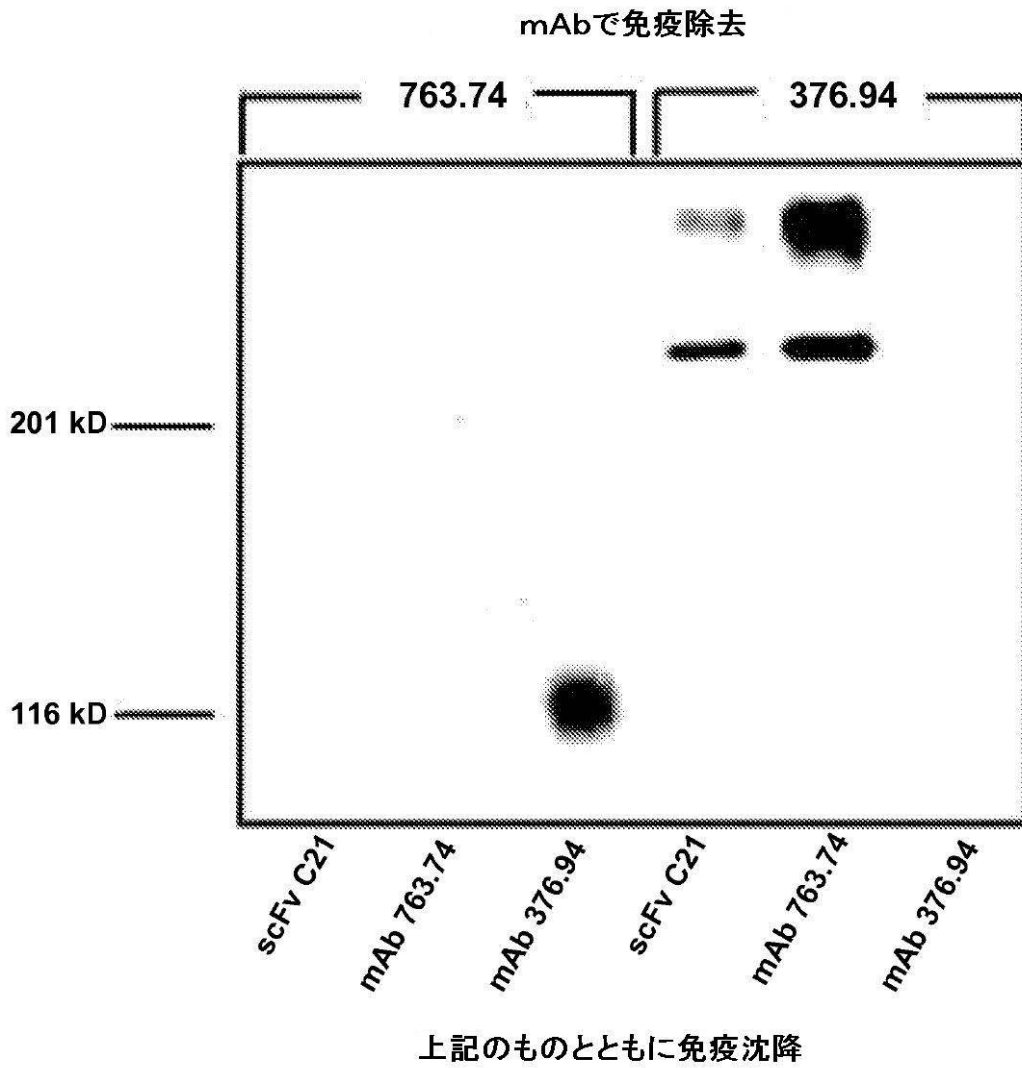
FIG. 23

scFv-FcC21によるMDA-MB-231のインビトロ細胞成長の阻害



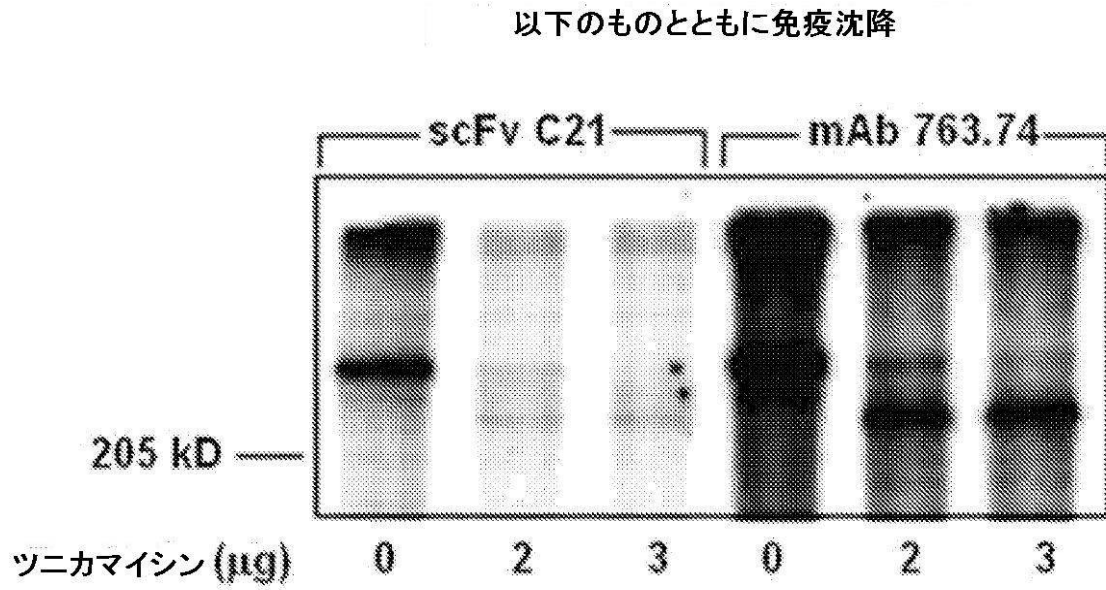
【 図 3 】

FIG. 3



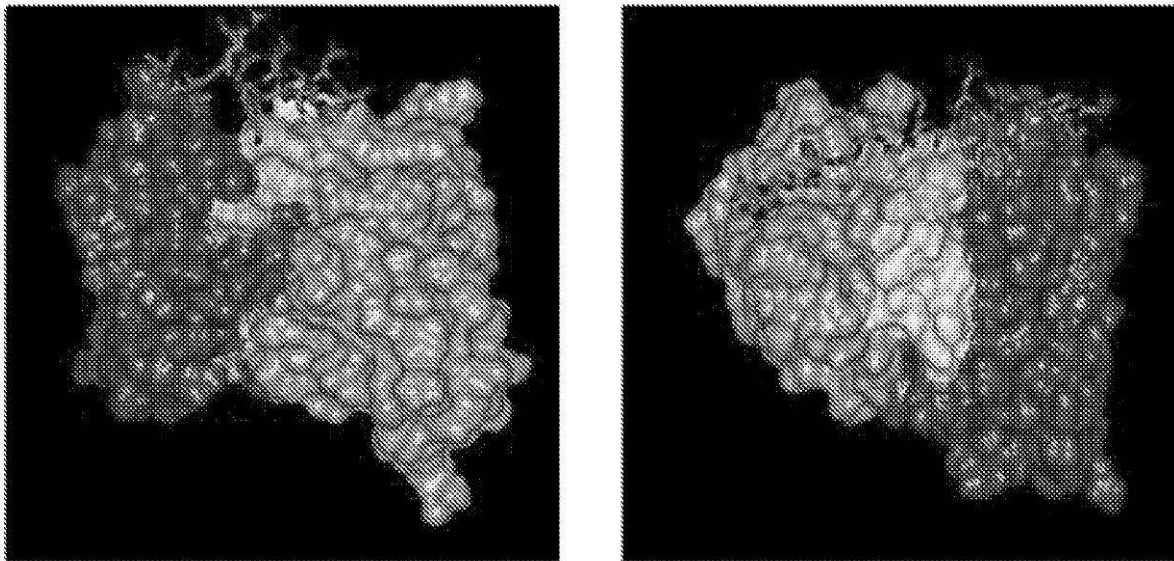
【 図 4 】

FIG. 4



【 図 13 】

FIG. 13



scFv C21-ペプチドP1C21複合体

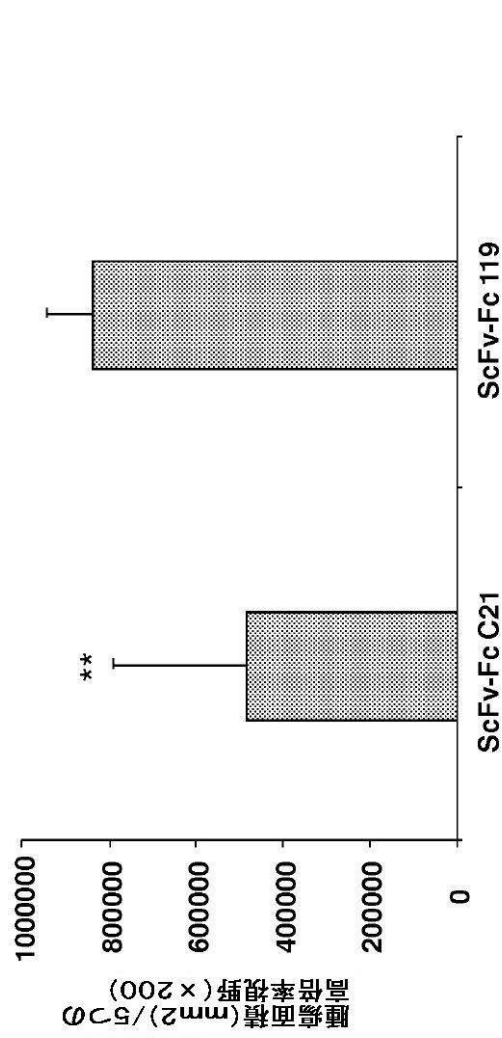
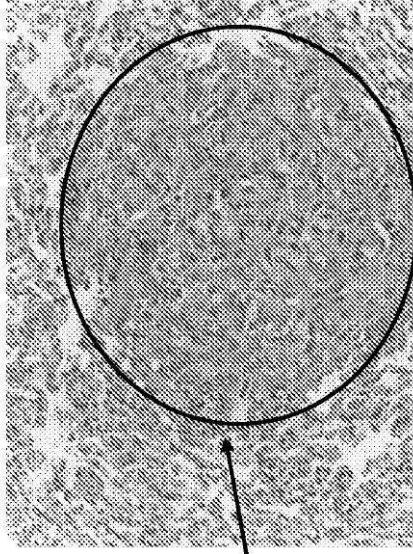
【 図 1 6 】

scFv-FcC21によるヒトメラノーマ細胞MV3の実験的肺転移の阻害

FIG. 16A



FIG. 16B

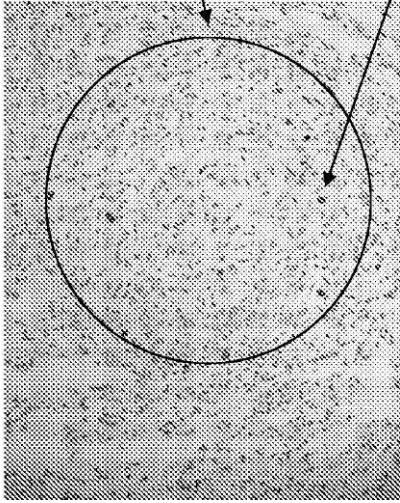


A. ScFv-Fc C21処置群 B.コントロールScFv-Fc 119 処置群

【 図 17 】

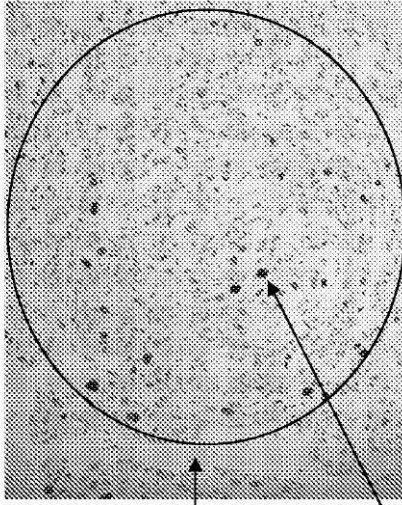
scFv-FcC21はマウス内の転移性病変における腫瘍細胞の増殖を阻害する

FIG. 17A

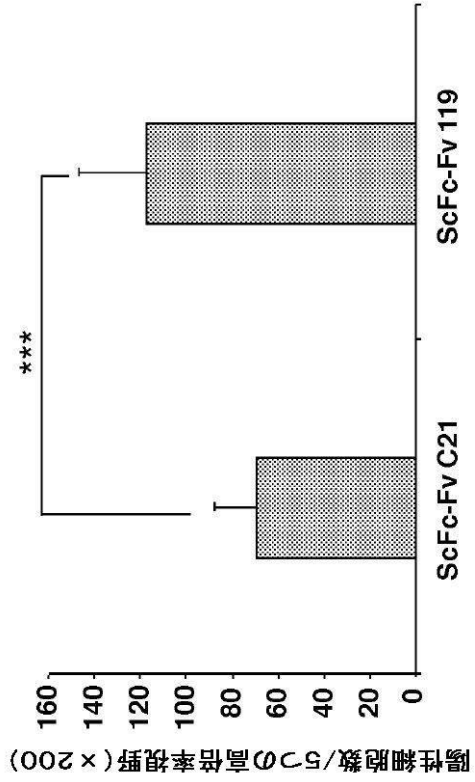


マウス肺における  
腫瘍小結節

FIG. 17B



茶色-p-ヒストンH3 (ser10) について  
陽性: 有糸分裂細胞の指標



A: ScFv-FcC21処置 B: アイソタイプコントロール処置 \*\*\* p=0.0005を示す。

FIG. 19  
scFv-FcC21による局所的腫瘍再発の阻害

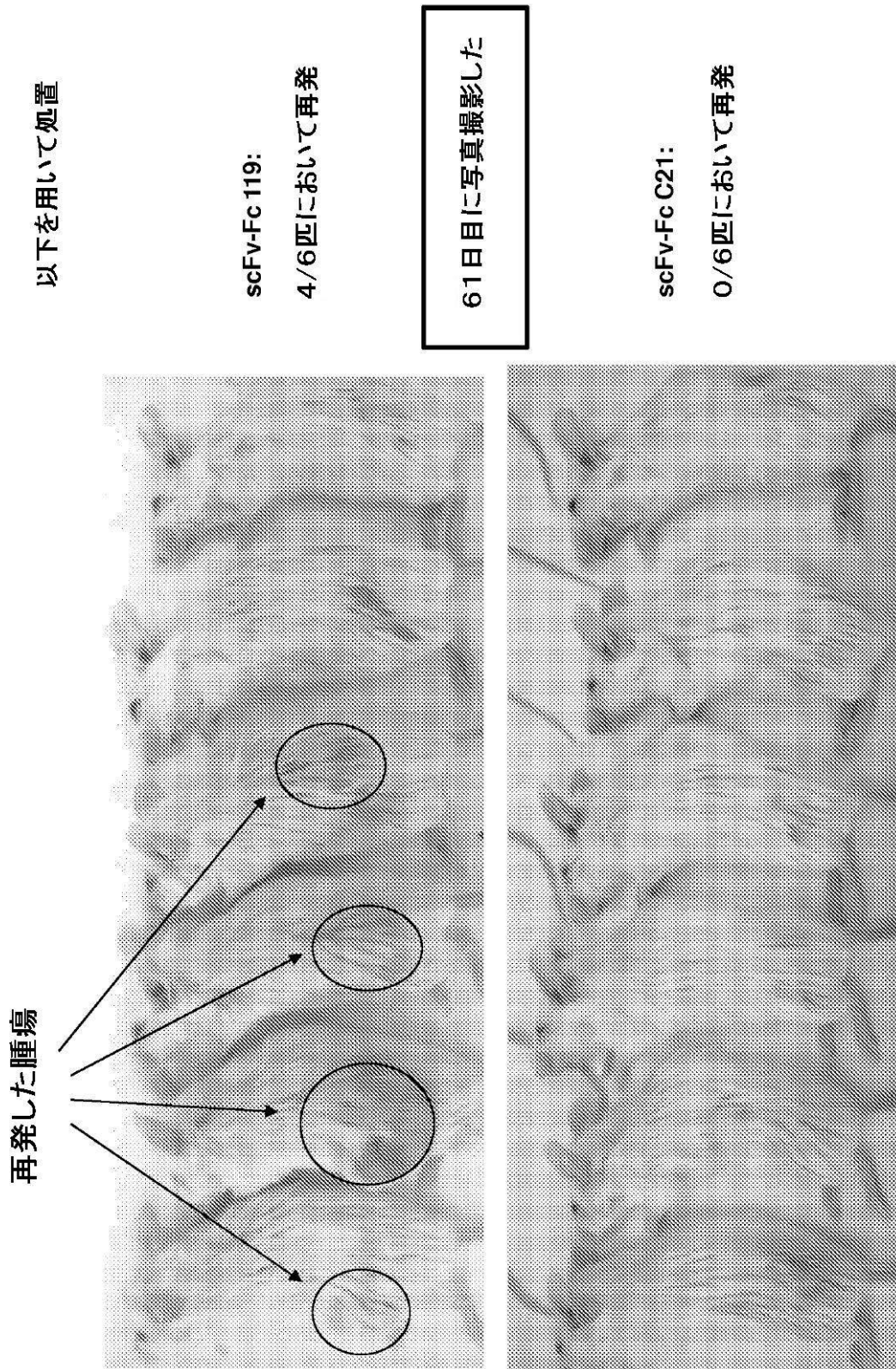
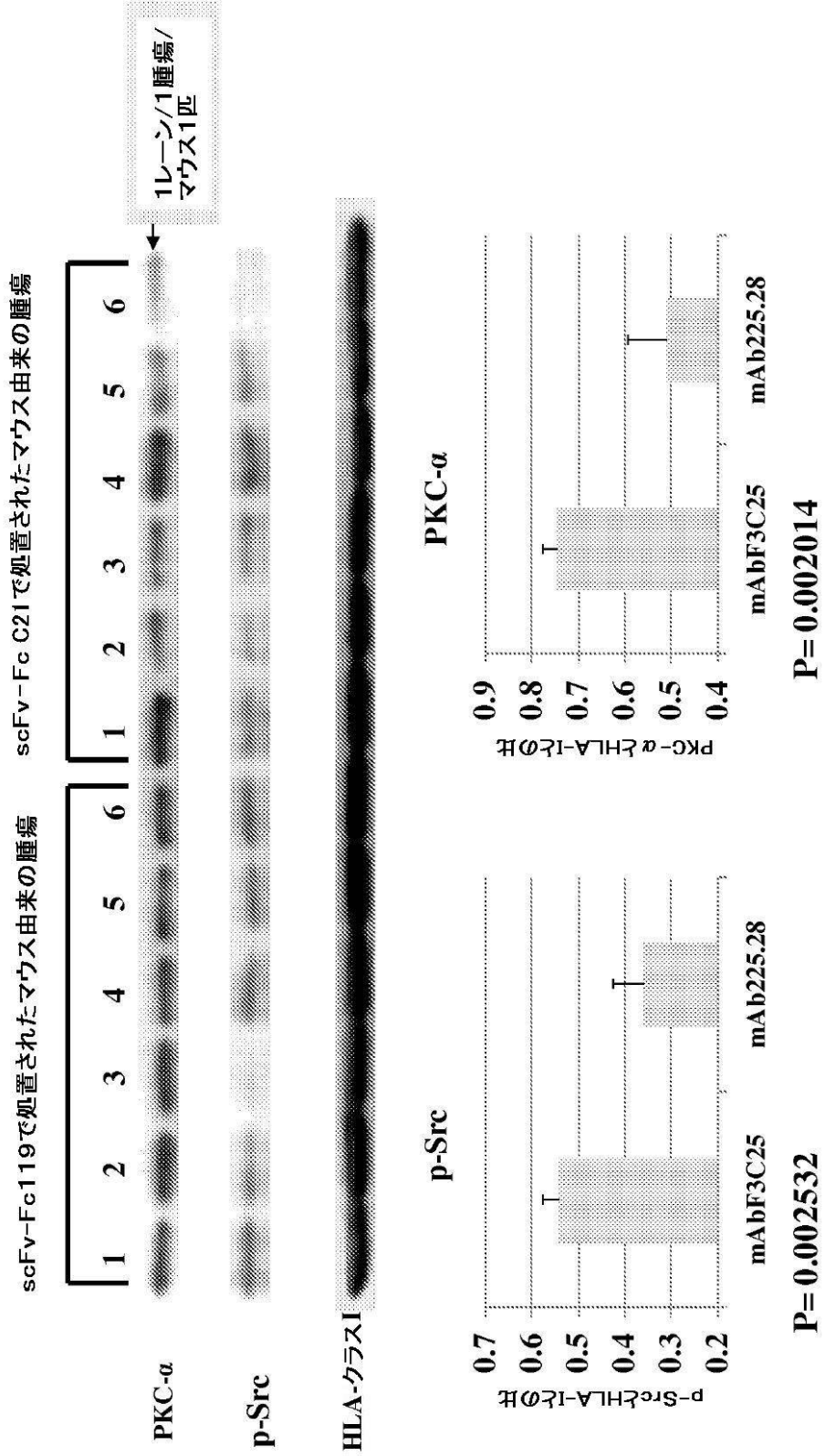


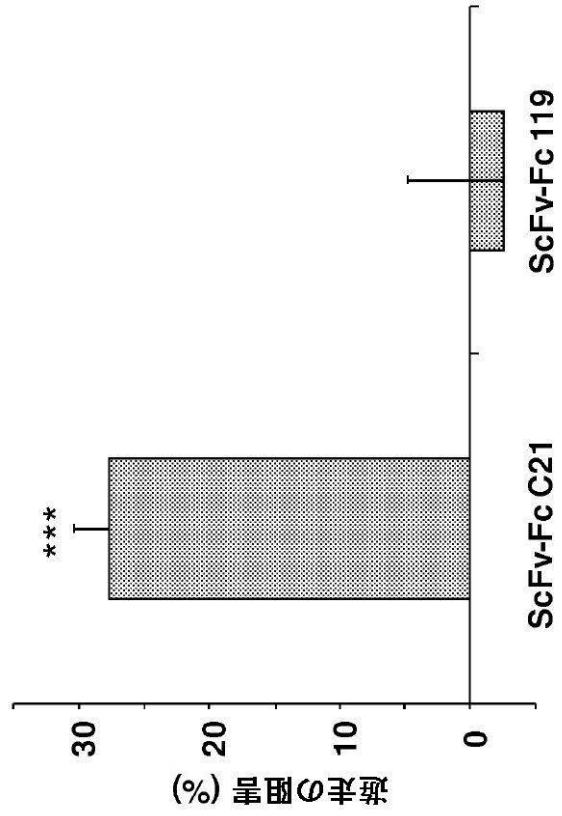
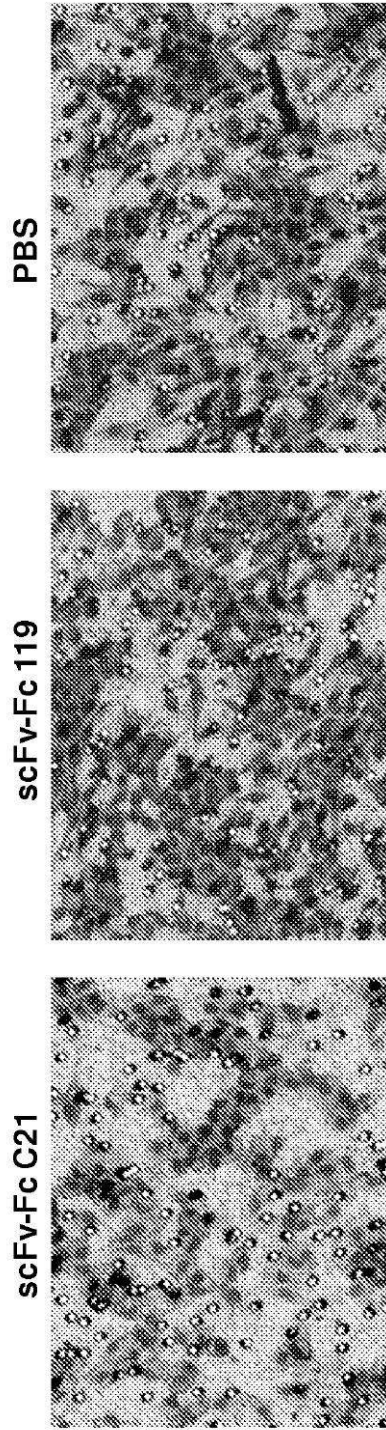
FIG. 21

外科的に取り出された原発性MV3腫瘍組織における、低減されたPKC- $\alpha$ レベルおよびp-Srcレベル



【 図 2 2 】

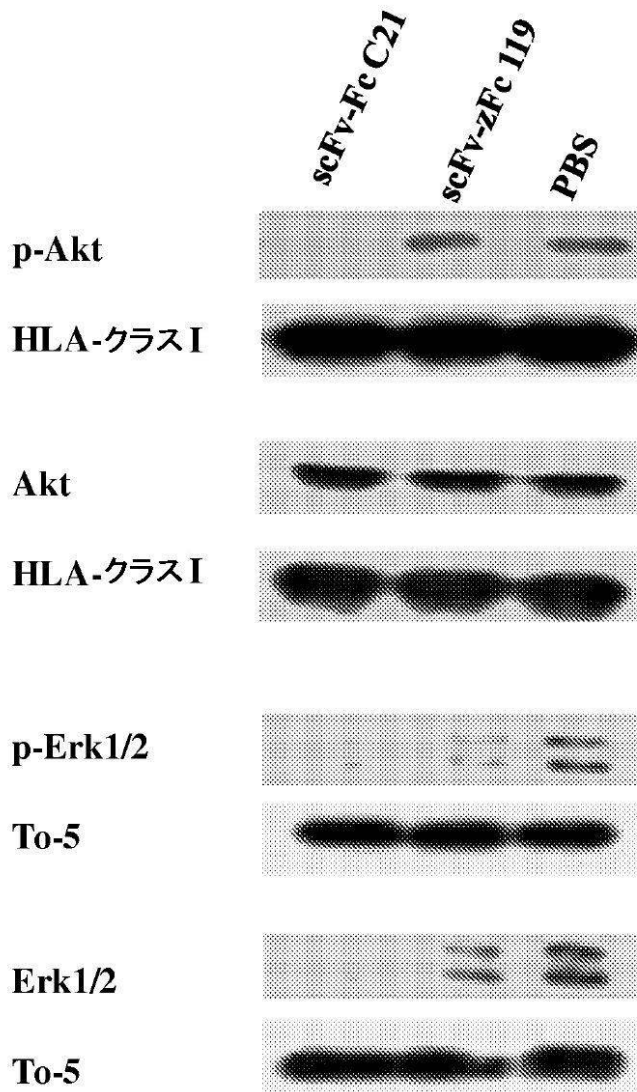
FIG. 22  
scFv-FcC21によるMDA-MB-231のインビトロ細胞遊走の阻害



【 図 2 4 】

FIG. 24

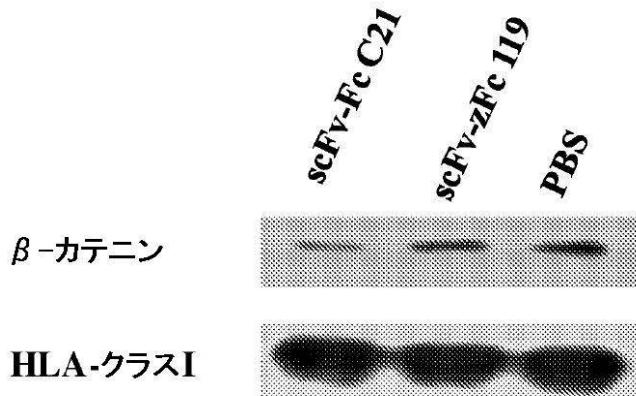
Akt, Erk1/2



【 図 2 5 】

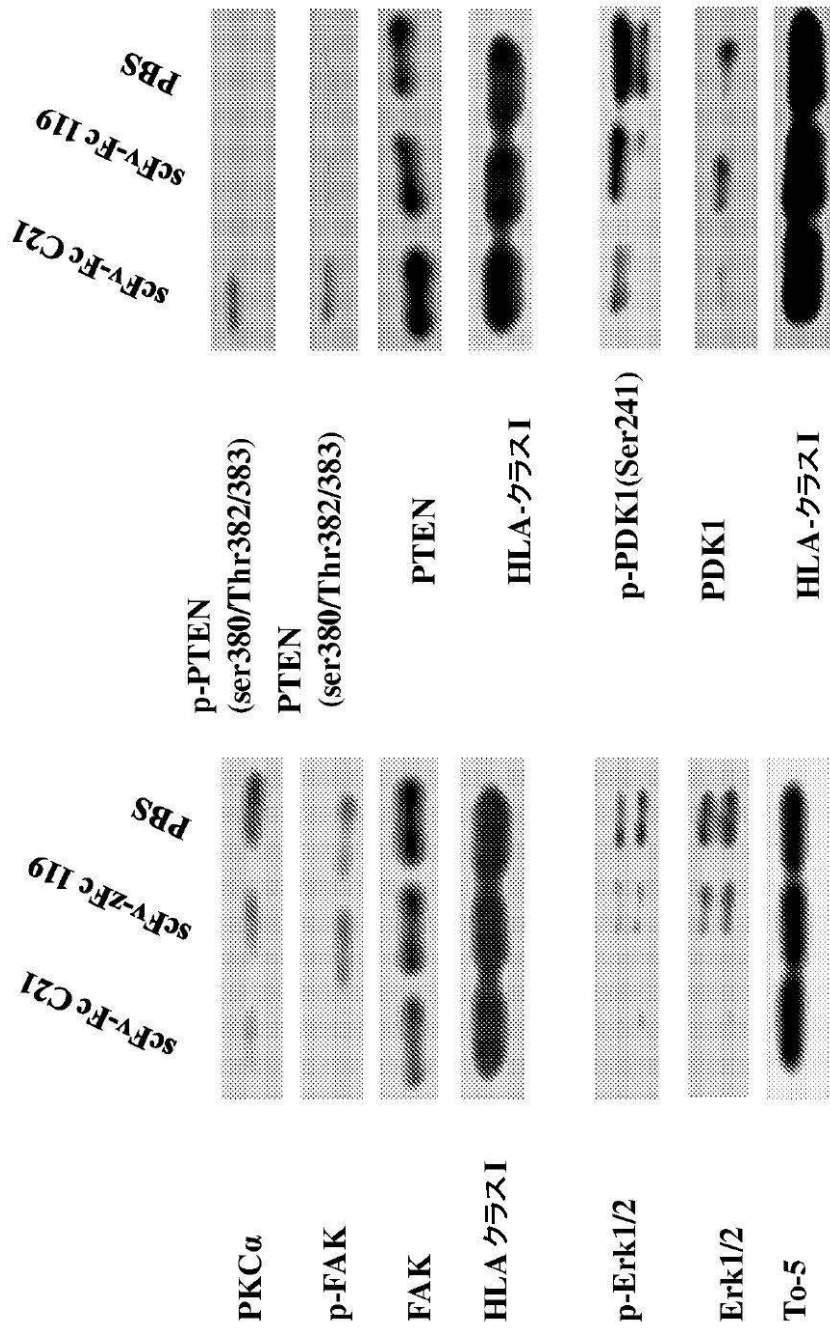
FIG. 25

Wnt/ $\beta$ -カテニン



【 図 2 6 】



FIG. 26



【 配列表 】

2012505659000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/US2009/060903</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C07K 16/18(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 16/18		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal), Delphion, Pubmed		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DESAI, S. A. et al. 'Characterization of human anti-high molecular weight-melanoma-associated antigen single-chain Fv fragments isolated from a phage display antibody library. Cancer Research. Vol. 58(11), pp. 2417-2425 (1 June 1998) See the abstract.	1-16,27-35
A	NORONHA, E. J. et al. 'Limited diversity of human scFv fragments isolated by panning a synthetic phage-display scFv library with cultured human melanoma cells.' Journal of Immunology. Vol. 161(6), pp. 2968-2976 (15 September 1998) See the abstract.	1-16,27-35
X	WAGNER, S. et al. 'Vaccination with a human high molecular weight melanoma-associated antigen mimotope induces a humoral response inhibiting melanoma cell growth in vitro.' Journal of Immunology. Vol. 174(2), pp. 976-982 (15 January 2005)	33-35
A	See the abstract; Table 1: Fig. 1-7.	1-16,27-32
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 31 MAY 2010 (31.05.2010)		Date of mailing of the international search report <b>01 JUNE 2010 (01.06.2010)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer KIM, JI YUN Telephone No. 82-42-481-8288 

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/US2009/060903**

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RIEMER, A. B. et al. 'High-molecular-weight melanoma-associated antigen mimotope immunizations induce antibodies recognizing melanoma cells.' <i>Cancer Immunology and Immunotherapy</i> . Vol. 54(7), pp. 677-684 (24 November 2004) See the abstract.	1-16, 27-35
A	LUO, W. et al. Differential immunogenicity of two peptides isolated by high molecular weight-melanoma-associated antigen-specific monoclonal antibodies with different affinities.' <i>Journal of Immunology</i> . Vol. 174(11), pp. 7104-7110 (1 June 2005) See the abstract.	1-16, 27-35

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2009/060903

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

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

1.  Claims Nos.: 17-26,36  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Said claims pertain to methods for treatment of the human body and methods of diagnosing on the human body, thus relate to a subject-matter which International Searching Authority is not required to search under PCT Art. 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv).
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
**PCT/US2009/060903**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
None			

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/US2009/060903**

(1) Claims 4-8, 10, 11, 13, 14, 16, 27, 29-33 does not comply with PCT Rule 6.4(a) because multiple dependent claims should not serve as a basis for any other multiple dependent claim.

(2) Claims 9,12, 15, 28, 34, 35 are too unclear to make meaningful search possible because the claims refer to claims which do not comply with PCT Rule 6.4(a)

(3) Although claims 4-16, 27-35 are not drafted in accordance with the second and third sentence of Rule 6.4(a) and Article 6, the search has been carried out.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	C 0 7 K 7/08	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Y
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/577	B
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	Z
	G 0 1 N 33/53	D
	C 1 2 P 21/08	

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

(72)発明者 ワン, シンファイ

アメリカ合衆国 ペンシルバニア 1 5 2 3 8, ピッツバーグ, パーク スクエア レーン  
2 1 3

(72)発明者 フェローネ, ソルダノ

アメリカ合衆国 ペンシルバニア 1 5 2 1 7, ピッツバーグ, アルバーマーレ アベニュー  
5 4 4 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA54 CA02 DA06 EA03 GA25 GA27 HA01  
4B064 AG27 BJ12 CA02 CA19 DA05 DA14  
4B065 AA26X AA98X AB01 AC14 BA02 BA24 BD50 CA25 CA44 CA46  
4C085 AA03 AA14 AA27 AA33 BB41 BB43 CC23 CC24 DD62 EE01  
GG02  
4H045 AA11 BA09 BA15 BA17 BA41 CA41 CA42 DA76 DA86 EA29  
EA51 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2012505659A5</a>	公开(公告)日	2012-11-29
申请号	JP2011532263	申请日	2009-10-15
[标]申请(专利权)人(译)	匹兹堡大学		
申请(专利权)人(译)	匹兹堡大学 - 中高等教育李化联合体系统		
[标]发明人	ワンシンファイ フェローネソルダノ		
发明人	ワン, シンファイ フェローネ, ソルダノ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/30 C07K19/00 C07K14/21 C07K7/06 C07K7/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61K39/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/04 G01N33/577 G01N33/574 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/04 C07H21/00 C07K16/3053 C07K2317/21 C07K2317 /56 C07K2317/622 C07K2317/73 C07K2317/75 C07K2317/76 C12N15/00 C12N15/62 C07K16/30 G01N33/57423 G01N33/5743 G01N2400/40 A61K39/0011 C07K14/705		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/30 C07K19/00 C07K14/21 C07K7/06 C07K7/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61K39/395.T A61K39/395.L A61K39/00.H A61K39/395.Y A61P35/00 A61P35/02 A61P37/04 G01N33/577.B G01N33/574.Z G01N33/53.D C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA54 4B024/CA02 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024/GA25 4B024 /GA27 4B024/HA01 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA26X 4B065/AA98X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA24 4B065/BD50 4B065 /CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085/AA27 4C085/AA33 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC23 4C085/CC24 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG02 4H045/AA11 4H045 /BA09 4H045/BA15 4H045/BA17 4H045/BA41 4H045/CA41 4H045/CA42 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	61/106055 2008-10-16 US		
其他公开文献	JP5836125B2 JP2012505659A		

#### 摘要(译)

本文公开了分离的人单克隆抗体及其功能片段，其特异性结合HMW-MAA。还公开了编码这些抗体的核酸，包括这些核酸分子的表达载体和表达核酸分子的分离的宿主细胞。抗体可用于检测样品中的HMW-MAA。本文公开了利用这些抗体诊断癌症或确认癌症诊断的方法。还公开了治疗患有癌症的受试者的方法。