

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-143738

(P2006-143738A)

(43) 公開日 平成18年6月8日(2006.6.8)

| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|------------------------------|-------------|-------------|
| C07K 16/42 (2006.01) | C07K 16/42 | 4B064 |
| G01N 33/577 (2006.01) | G01N 33/577 | 4C085 |
| A61K 39/395 (2006.01) | A61K 39/395 | 4H045 |
| A61K 39/00 (2006.01) | A61K 39/00 | |
| A61P 35/00 (2006.01) | A61P 35/00 | |

審査請求 有 請求項の数 3 O L (全 36 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|--------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2005-346456 (P2005-346456) | (71) 出願人 | 597011463 |
| (22) 出願日 | 平成17年11月30日 (2005.11.30) | | |
| (62) 分割の表示 | 特願平10-249573の分割 | | |
| 原出願日 | 平成5年5月14日 (1993.5.14) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 9210930 | (74) 代理人 | 100062144 |
| (32) 優先日 | 平成4年5月22日 (1992.5.22) | | 弁理士 青山 稜 |
| (33) 優先権主張国 | 英国 (GB) | (74) 代理人 | 100067035 |
| (31) 優先権主張番号 | 9210929 | | 弁理士 岩崎 光隆 |
| (32) 優先日 | 平成4年5月22日 (1992.5.22) | (74) 代理人 | 100064610 |
| (33) 優先権主張国 | 英国 (GB) | | 弁理士 中嶋 正二 |
| (31) 優先権主張番号 | 9210944 | (72) 発明者 | ヘルムート・エッケルト |
| (32) 優先日 | 平成4年5月22日 (1992.5.22) | | スイス国ツェーハー-4101オーバービル、 ホーエ・シュトラーセ167番 |
| (33) 優先権主張国 | 英国 (GB) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ルイスY-特異的モノクローナル抗体BR55-2に対する抗イディオタイプモノクローナル抗体およびその使用

(57) 【要約】

【課題】モノクローナル抗体BR55-2 (Ab1)に対するマウスモノクローナル内部像抗-イディオタイプ抗体 (Ab2)の発生、産生および特徴付を提供すること。

【解決手段】モノクローナル抗体BR55-2 (Ab1)に対するモノクローナルマウス内部像抗-イディオタイプ抗体 (Ab2)により解決される。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

モノクローナル抗体 B R 5 5 - 2 (A b 1) に対するモノクローナルマウス内部像抗イデオタイプ抗体 (A b 2) であって、 A b 1 に対し 1 0 倍過剰またはそれ以下の濃度において、 B R 5 5 - 2 マウス I g 2 a のルイス Y 陽性ヒト乳癌細胞系に対する結合阻害で評価したとき、 9 5 % またはそれ以上の阻害能を有する、内部像抗イデオタイプ抗体 (A b 2) 。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のモノクローナルマウス内部像抗イデオタイプ抗体 (A b 2) を、薬理的に許容可能なアジュバント、担体または希釈剤と共に含む、ルイス Y 炭水化物発現細胞に対する免疫応答を産生するための免疫化用医薬組成物。

10

【請求項 3】

請求項 1 に記載のモノクローナルマウス内部像抗イデオタイプ抗体 (A b 2) を含む、 B R 5 5 - 2 のイデオタイプおよび B R 5 5 - 2 に対する結合特性を有する分子の定量的測定用試薬。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

1. 背景および導入

免疫系を使用する一つの研究は、イデオタイプの相互作用を基本にしている。一つの抗体を他のものと区別する、 I g 分子の抗原結合部位中および回りの独特な抗原決定基はイデオトープとして定義されている。与えられた抗体の可変領域に存在する全てのイデオトープを合わせてそのイデオタイプ (i d) と呼ぶ。イデオタイプの分子構造は相補性決定領域および可変領域のフレームワーク領域の両方に局所的であり、常にではないが一般的に、特異的に関連する重および軽鎖の両方からなる。

20

【 0 0 0 2 】

イデオタイプは、同系、同種異系または異種受容体中への抗体 (しばしば A b 1 と呼ぶ) の注射が抗イデオタイプ抗体 (しばしば A b 2 と呼ぶ) の産生を誘発するため、血清学的に定義された実在物である。イデオタイプ / 抗イデオタイプ相互作用が存在するという仮定を基にして、生理学的に免疫系の受容体基本制御は、ニールス・ジェルネ (アナリティカル・イムノロジー、 1 2 5 C、 3 7 3、 1 9 7 4) により仮定されている。彼のネットワーク理論は、免疫系を、各々抗原決定基 (エピトープ) をその結合部位 (パラトープ) を通して認識でき、各々本系の他の抗体または細胞表面受容体をそれを表示するイデオトープを通して認識できる I g 分子および T - リンパ球上の受容体の収集物として見なす。多くの研究が、イデオタイプおよび抗イデオタイプ受容体が B - および T - リンパ球の表面およびその分泌する抗体に存在することを実際証明している。

30

【 0 0 0 3 】

A b 1 および A b 2 の間の結合が A b 1 が引き寄せられる抗原により阻害される場合、抗原認識を司る部位を抗体可変領域上に含むため、イデオタイプは結合部位関連と見なされる。これらの形態的には疑似抗原エピトープであるイデオタイプは、これらのエピトープの内部像と言われる。 A b 2 および抗原の両方が関連 A b 1 に結合しているため、それらは与えられた抗原の内部像を意味する同様の三次元構造を分け合っている。原則として内部像抗イデオタイプ抗体は、それから抗原がイデオタイプネットワークを経由して派生する抗原の置換基として見ることができる。従って、これらの代用抗原は活性免疫化プロトコールにおいて使用し得る。例えば、それらは、起源の抗原が明白な免疫反応を誘発するのに十分に免疫化されていなければ、利点を提供する。このように、非免疫源性炭化水素抗原に疑似の好適な内部像抗イデオタイプ抗体は、特にあるワクチン研究に有用であり得る。下記に、これらの論題を更に具体的に扱う。

40

【 0 0 0 4 】

ハイブリドーマ技術の導入の結果、ほとんどマウス起源であるモノクローナル抗体 (M

50

a b)が、多くの人の癌の型に対して作られている。異種M a bにより検出されるほとんど全てのマーカーは、厳密には癌特異的ではないが、癌およびある正常および/または胎児組織に分離する分化抗原である。従って、それらは癌関連抗原(T A A)と最も良く呼ばれる。異種M a bにより検出された人癌マーカーが癌患者の抗癌反応を引き起こせるかどうか、このような抗原が、癌患者の自己の癌に対する反応に実際関連するかどうか、各々のT A Aの性質に依存するが、まだ充分には理解されてない。同系宿主内で天然に免疫源か、免疫源を製造できるいずれかのT A Aは、治療のためにおよび恐らくは予防的利点で抗癌免疫を誘発するのに有効である可能性がある。

【0005】

癌関連抗原は、しばしば“自己”の一部であり、癌患者における非常に乏しい免疫反応を誘発する。比較して、各々のT A Aの構造的エピトープに似ている三次元形を示す内部像抗イディオタイプ抗体は、癌をもつ宿主内では外部分子として認識される。従って、好適な抗-i d M a bによる治療的または予防的でさえある免疫化により上昇した免疫反応は、抗癌免疫の原因となり得る。

10

【0006】

抗-i d M a bによる癌に対する治療的免疫化は、特に疾病の初期段階で好結果である。初期癌の手術の時、しばしば隠れた一つの癌細胞が既に患者の種々の器官内に転移している。これらの微小転移細胞は、しばしば臨床的に証明された癌組織診断および外科的手術による除去の数年後の転移癌の成育の原因となることは知られている。これまで、ほとんど全ての場合において、上皮細胞起源の転移癌が治療不可能である。従って、“最小残余癌”の有効な処置、例えば、巨大転移癌へ成長するのを予防するための隠れている微小転移細胞の破壊は、緊急の医学的要求である。病気のこの段階(アジュバント位置付け)において、既知の化学療法研究はむしろ悪結果である。しかしながら、最小残余癌の段階における好適な内部像抗-i d M a bによる免疫化による特異的抗癌免疫の導入は、免疫系により微小転移細胞を選択的に除去し得、増加した再発のない生存期間をもたらす。

20

【0007】

B R 5 5 - 2に特異性のあるモノクローナル抗体(例えば、ウイスター、欧州特許第285059号、エム・プラスチック・スリンら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、262(1987)372-379またはゼット・ステプルスキーら、ハイブリドーマ、9(1990)201-210参照)は、人の固体癌の大部分に選択的に発生する炭化水素決定基であるルイスY6抗原を同定する。その特性を基本にして、抗体B R 5 5 - 2は、基本的に上皮癌の受動免疫治療に使用できる。

30

【0008】

胚発生のある段階の間にもまた発生するルイスYオリゴサッカライド決定基関連癌はそれ自身ほとんど免疫源性ではない。しかしながら、ルイスY抗原の構造エピトープに似せることにより内部像特性を伴う、B R 5 5 - 2(A b 1)に対するモノクローナル抗イディオタイプ抗体(A b 2)は、特に疾患の初期段階で、保護的抗癌免疫性を導入するのに有用である。

【0009】

上皮起源の癌上への発現に加えて、ルイスY炭化水素抗原はまた人免疫不全ウイルス(H I V)の感染の病理発生にもまた含まれる。後天性免疫不全症候群(A I D S)は、その病因がリンパ栄養性レトロウイルス(H I V)の感染に関連するものとして同定されている明瞭な疾病として認識されている。本疾病は損なわれた細胞媒介免疫および完全な血中ヘルパーリンパ球減少症、特に減少したヘルパーT-リンパ球(C D 4)に関連する疾患により特徴付けられる。A I D Sは、指定された臨床的特性のコンプレックスおよび血中T-リンパ球減少症により通常明示された前症候群が先である。前症候群は、A I D S関連コンプレックス(A R C)と呼ばれる。

40

【0010】

H I Vは、過去20年にわたって徹底的に研究されているウイルスの群に属する。レトロウイルスが人または動物細胞に侵入した場合、R N AはD N Aに変わり、宿主細胞内へ

50

挿入し、次いで細胞自身のものであるかのようにウィルスの遺伝子を処置してしまう。HIVは数年間この細胞内に潜んで残り、体内の免疫系からの攻撃から安全で、宿主細胞が分裂する度に盲目的に複製されることができる。感染された細胞の活性化により急速なウィルス複製の引金がかかれた場合のみ、産生されたウィルス分子が細胞を殺し、血流中へ流れ出す。

【0011】

HIVの特異的特性のため、既に人ゲノム中へ転写されたウィルスおよびプロウィルス両方の遺伝子情報を、既に感染した患者から除くことによる治療は成し遂げるのが難しい。従って、ほとんどの治療の試みは、ウィルス複製の本質的な段階を妨げることにより病気の進行を遅くする薬剤に集まっている。

10

【0012】

安全で有効なワクチン的手段によるHIV-感染の予防および既に感染した患者の治療的介入が主要なゴールである。幾つかのワクチン研究が、前臨床または初期臨床段階で試験されている。それらは主に抗原としてのウィルス構造、特に、主要エンベロープグリコプロテインgp120を基本にしている。

【0013】

ウィルスに対して自然に発生する免疫反応はすべてのウィルスタンパク質に対する抗体および細胞性免疫の活性化からなる。しかしながら、HIV-感染に対するこの宿主反応は、しばしば数年にわたり持続する無症候期間後の病気の進行を最終的に停止させるようには思えない。したがって、自然に発生し、最終的には非保護免疫反応の原因となる同じ抗原を基本にしたワクチン研究は、疑わしいままである。一つの主要な問題は、それによりウィルスがタイプ特異的中和抗-gp120抗体の攻撃から逃れられるHIVの広範な異質性である。

20

【0014】

ワクチンによる有効なHIVの防御は、2つ：一つは血流中のウィルスの自由な移動に対して、もう一つは既に感染された細胞に対しての防御方法が必要である。インビトロおよびインビボHIV感染細胞は、その表面に変化したグリコシル化パターン、すなわちルイスY炭化水素決定基を示すことは知られている。本抗原が通常ある胎児発育段階の間においてのみ発生し、種々の悪性度にまた関連するため、HIV-感染細胞上の発現は、レトロウィルス形質転換により誘発されたその別の分化状態を反映し得る。したがって、この表面表現型は、人ゲノムのHIVによる形質転換に対する独特な細胞性宿主反応に似ている。

30

【0015】

HIV外被グリコプロテインは、感染細胞の機械的グリコシル化により行われる。従って、HIVにより製造される感染細胞のグリコシル化パターンの変化はまた自由に遊離されるウィルス分子上に見られる。結果として、このような細胞内で産生するHIVの外被グリコプロテインは、またルイスY炭化水素決定基からなる。従って、ルイスYオリゴサッカライドは、HIV感染細胞および遊離HIV-分子の両方に発現される特異的宿主反応を示す。

【0016】

上記の考慮を基にして、ルイスY構造は、遊離ウィルスおよびHIV-感染細胞の両方に対するワクチン化法の使用の重要な必要性を満たす。更に、一般に、宿主がHIVに対して反応するためには、ルイスY抗原はHIV種から独立して、そのウィルスの遺伝的変異性により影響を受けない。不幸にも、その炭化水素構造およびその胎児分化抗原としての“自己”特性を基本にして、ルイスYはそれ自身ほとんど免疫源性ではない。この抗原に対する自然の免疫反応は人では検出されていない。しかしながら、ルイスY抗原の構造エピトープに似せることにより内部像特性を有するBR55-2(Ab1)に対するモノクローナル抗イディオタイプ抗体(Ab2)は、ウィルス種と無関係な、遊離HIVおよびHIV感染細胞に対する予防的および治療的免疫の導入に有用であり得る。

40

【0017】

50

独特なワクチンとしてのその予防的および治療的使用に加えて、モノクローナル内部像抗 - i d 抗体は、それが発生した抗体のイディオタイプに対して非常に特異的な試薬である。それらはほとんど A b 1 の結合領域を排他的に認識する。この認識パターンは A b 1 の他の決定基とは無関係である。言い換えると、好適な抗 - i d M a b は、その正確な三次元構造において、A b 1 の独特なイディオタイプからなる任意の分子を選択的に同定にする。従って、これらの抗 - i d M a b は、A b 1 の F (a b ')₂ - 、 F a b - および F v - 断片およびその変更変異体 (変更変異体は異なった定常領域、例えばマウス I g G 2 a 、 I g G 2 b 、 I g G 1 からなるが、同一のイディオタイプを分けあっている) に、同等の親和性で結合する。加えて、内部像抗 - i d M a b のこの高い特異的認識パターンはまた組み換え D N A 技術により得られた親マウス M a b の変異体を含む。

10

【 0 0 1 8 】

人の受動免疫治療におけるマウス抗体の反復使用により可能性のある問題に打ち勝つために、マウス / 人キメラ M a b が、選択した親マウス M a b の可変領域と人の定常領域を結合させることにより産生できる。人血清におけるこのようなマウス / 人キメラ M a b の検出のために、これらのキメラ M a b が人の免疫グロブリンで自然に発生するのと同じ定常領域を有するため、非常に特異的な試薬が必要である。親マウス A b 1 に対して発生した内部像抗 - i d M a b は、それ由来のキメラ抗体をまた認識する。これにより、このような抗 - イディオタイプ M a b が、例えば大過剰の正常人免疫グロブリンの存在下、マウス / 人キメラ M a b の血清濃度の特異的および感受性定量的測定に有用な試薬である。受動免疫治療に使用するための臨床的に興味深い特性により M a b の特性を更に改善するために、親マウス抗体の最小必要部分、相補性決定領域 (C D R) のみが人可変領域フレームワークおよび人定常領域と結合している “完全に人化した” 抗体が、組み換え D N A 技術により構築できる。これらの “完全に人化した” M a b の設計および構築のために、配列相同性および分子造形モデルが、更に免疫源性は減少しているが、結合特性は有するマウスおよび人配列要素の組み合わせの選択のために使用される。親マウス A b 1 のイディオタイプに対して発生したある内部像抗 - i d M a b は、もし以下の要求：

20

a) 人化変異体の結合領域の三次元構造が、親マウス抗体のものと非常に似ている

b) 特異的な抗 - i d 抗体が、正確にこの結合領域の三次元構造を認識する (“真正内部像抗体”)

が満たされていれば、C D R - 移植人化変異体に結合し得る。

30

【 0 0 1 9 】

従って、上記特性を有する抗 - イディオタイプ M a b は、例えば大過剰の正常人免疫グロブリンの存在下、完全に人化した (C D R - 移植) M a b の血清濃度の特異的および感受性定量的測定に特に有用な試薬である。

【 0 0 2 0 】

本発明は、モノクローナル抗体 B R 5 5 - 2 (A b 1) に対するマウスモノクローナル内部像抗 - イディオタイプ抗体 (A b 2) の発生、産生および特徴付に関する。本発明の更なる部分はこれらの抗 - イディオタイプ M a b の、上皮起源の癌および小細胞肺癌および H I V - 感染が原因の疾病の有効な治療および予防的免疫化のための使用である。更に、これらの抗 - イディオタイプ M a b の、キメラおよび完全に人化された変異体 (W O 9 2 / 0 3 1 6 5 に記載のような) を含む B R 5 5 - 2 の特性を有する抗体またはその断片および誘導体の高い選択的および定量的測定および B R 5 5 - 2 の特性を有する分子に一般に適応可能な選択的免疫親和精製法への使用もまた本発明の一部である。

40

【 0 0 2 1 】

2 . 抗体 B R 5 5 - 2 のイディオタイプに対するマウスモノクローナル抗 - イディオタイプ抗体の発生および特徴付

望ましくない抗 - イソタイプ免疫反応を最少にする試みにおいて、B R 5 5 - 2 、 マウス I g G 3 の F (a b ')₂ - 断片を免疫化のために選択した。マウス M a b B R 5 5 - 2 のイディオタイプに対するマウス抗 - i d M a b の十分な発生のために、同系宿主における好適な免疫反応を上昇させるために、免疫源性を最大にすることが重要である。したが

50

って、Fc - 部分が欠けている(開裂および精製は欧州特許出願第528,767号に記載)F(ab')₂ - 断片を、免疫源担体としてのキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)に、記述された方法(ジェー・カールソンら、バイオケミカル・ジャーナル、173、723、1978)にしたがって、異種二機能性リンカーN - サクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオ)プロピオネート(=SPDP)を使用して結合した。

【0022】

Balb/cマウスを、マウスMabを発生させるのに典型的なプロトコールを基本にして、フロインド完全アジュバントを使用してBR55 - 2 / マウスIgG3 - F(ab')₂ - KLH - 接合体で免疫化した。反復免疫化に続いて、マウス脾臓細胞を、マウスミエローマ細胞系SP2 / 0と融合した(実験の詳細は実施例1参照)。

10

【0023】

培養されたハイブリドーマ細胞の好適な選択のために、その上清の連続した試験を行った。選択は以下の基準:

a) 上清中のマウスIgGの濃度を測定することによるハイブリドーマの分泌率(実験の詳細は実施例2参照)。大量のマウスIgGを産生する細胞は、単一細胞培養にサブクローン化した。

b) BR55 - 2 / マウスIgG3のF(ab')₂ - 断片に対する選択した上清の結合(実験の詳細は実施例3参照)。

c) 選択した上清による、BR55 - 2 / マウスIgG2aのルイスY抗原陽性SKBR5人乳癌細胞への結合の阻害(実験の詳細は実施例4参照)。

20

を基本にした。

【0024】

後者の試験は、Ab2'の内部像特性を示すために考案される。免疫化に使用したBR55 - 2 / マウスIgG3のF(ab')₂ - 断片のAb2'認識残存定常領域の検出を最少にするために、BR55 - 2のマウスIgG2a変更変異体を結合に使用した。本試験は、試験a)のIgG濃度測定試験を基本にした定量法で行った(実施例2)。更に、過剰の非特異的マウス - IgGを、BR55 - 2のイディオタイプに特異的でないAb2'の検出を避けるために、本阻害実験に加えた。95%以上の阻害能力(BR55 - 2 / マウスIgG2aのSKBR5細胞系への結合の阻害)を有するIgGを産生するハイブリドーマを選択した。

30

【0025】

上記の試験法を使用して、6種の異なったハイブリドーマが最終的に選択され、発展させた(E4、C11、B3、B9、G6、G9)。すべての6種のハイブリドーマは、マウスIgG1を、ウサギ - 抗 - マウス - IgG1 / ペルオキシダーゼ(ツィメッドのような試薬)を使用したサブタイプELISAで検出されたように産生する。

【0026】

全ての6種のハイブリドーマを、ローラーフラスコ(G培地中37、5%CO₂; 3、4日毎に培地を変える)中で培養し、上清を回収し、続いて精製した。

【0027】

各々抗 - idBR55 - 2Mabを含有する各々の上清を、免疫親和性クロマトグラフィーを使用して精製した。一般に、親和性クロマトグラフィーは非動化配位子と興味の対象の物質の間の相互作用を基本にしている。抗 - イディオタイプ抗体BR55 - 2の場合、親和性カラムのための非常に特異的な配位子は、選択した抗 - イディオタイプMabに結合するMabBR55 - 2 / マウスIgG2aである(実験の詳細は実施例5参照)。

40

【0028】

単離された抗 - idBR55 - 2Mab(E4、C11、B3、B9、G6、G9)の精製度は、分析的FPLCイオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、SDS - PAGEおよび等電点電気泳動により試験した。全ての6種の抗 - idBR55 - 2Mabの純度は>95%であった(実験の詳細は実施例6参照; SDS - PAGEおよび等電点電気泳動は図1および2に示す)。

50

【0029】

精製抗 - i d M a b を、B R 5 5 - 2 / マウス I g G 3 のルイス Y 抗原陽性 S K B R 5 細胞系への結合を阻害する能力を測定することにより、定量的に特徴付けた。全ての抗 - i d M a b は、1 : 1 化学量論を基本にして A b 1 のその抗原への結合を阻害する (実験の詳細は実施例 7 参照 : 代表的な結果を図 3 に示す)。

【0030】

上記の抗 - i d B R 5 5 - 2 M a b の内部像特性およびその代用癌抗原としての使用の決定的な確証は、異なった種の癌関連抗原に対する A b 3 反応を発生する能力に基づく。エヌ・ジェルネのネットワーク理論に従って、内部像抗 - i d M a b (A b 2) による免疫化により誘発される抗体 (A b 3) は、A b 1 と同様の結合特性を有する。従って、抗 - i d B R 5 5 - 2 M a b での免疫化により引き起こされる免疫反応は、ルイス Y 抗原陽性癌細胞に特異的である。結果として、防御抗癌免疫は人において抗 - i d B R 5 5 - 2 M a b による免疫化により誘発し得る。

10

【0031】

A b 3 反応の特性の調査のために、ウサギおよびアカゲザルを、抗 - i d B R 5 5 - 2 # 4 ならびに担体およびアジュバントとしての水酸化アルミニウムで免疫化した。この緩和アジュバントは、人に使用する異なったワクチンに広く使用されている。陰性対照として、動物をまた同量の非特異的マウス - I g G 1 で免疫化した。5 週間の間の 4 回の免疫化の後、血清を 9 週目で回収した (実験の詳細は実施例 8 参照)。血清 I g のルイス Y 抗原陽性 S K B R 5 乳癌細胞系およびルイス Y 抗原陰性 W M 9 メラノーマ細胞系への結合を測定した (実験の詳細は実施例 9 および 10 参照)。

20

【0032】

抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 は、ウサギおよびアカゲザルの両方において、高抗体価液性免疫反応を示す。抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 で免疫化した動物の血清 I g は、ルイス Y 抗原陽性 S K B R 5 細胞系に選択的に結合するが、ルイス Y 抗原陰性 W M 9 メラノーマ細胞系には結合しない。比較して、非特異的マウス - I g G 1 での免疫化では、ほとんど全く癌細胞結合血清 I g は検出されない。これらの結果は表 1 に要約する。図 4 および 5 において、ウサギおよびアカゲザルの免疫化前および免疫化血清により、細胞 - E L I S A (S K B R 5 細胞) で得られた代表的な I g - 結合曲線を示す。抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 で免疫化した動物の血清 I g の S K B R 5 細胞への結合は、血清の 1 : 1 0 0 0 0 希釈でもまだ検出できる。

30

【0033】

最初の免疫化課程の 2 年後、各々のアカゲザルは、抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 または非特異的マウス - I g G 1 の最初の単一追加抗原注射を受ける。同様の方法で、2 回目の単一追加抗原注射を、最初の免疫化の 3 年後 (= 最初の追加免疫の 1 年後) に受ける (実験の詳細は実施例 8 参照)。血清をこれらの追加免疫の前および後に回収する。

【0034】

抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 でワクチン処理したアカゲザルの全液性免疫反応を、マイクロタイタープレートを覆った抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 を基にした E L I S A を使用して測定した (実験の詳細は実施例 13 参照)。全てのアカゲザルの血清において、最初の免疫化工程および最初および 2 回目の免疫追加の後に、非常に高い抗体価免疫反応が見られる。I g の抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 への結合は、血清の 1 : 5 0 0 0 0 希釈でもまだ観察できる。幾分低い、まだ非常に明白な抗体価が、免疫追加の前にも血清で見られる。これらの結果は図 6 - 8 に示す。

40

【0035】

非特異的マウス - I g G 1 でワクチン処理したアカゲザルの液性免疫反応もまた上記と同じ E L I S A を使用して検出した (実験の詳細は実施例 13 参照)。期待されるように、I g の抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 に結合する血清抗体価は、抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 でワクチン処理したアカゲザルの血清で見られる抗体価より低い。非特異的マウス - I g G 1 で免疫化したアカゲザルの免疫反応が、抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 の定常領域と

50

交差反応するが、抗 - i d の超可変領域を指向する免疫反応の部分が欠けている。これらの結果は図 9 - 10 に示す。

【 0 0 3 6 】

免疫反応の癌特異性の証明のために、最初の免疫工程後および追加免疫の前および後、サル血清 I g の数種のルイス Y 抗原陽性癌細胞系 (乳、胃、腸および小細胞肺癌) およびルイス Y 陰性メラノーマ細胞系への結合を測定した (実験の詳細は実施例 10 参照)。最初の免疫化の 2 年後および最初の追加免疫前に抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 で処置したアカゲザルにおいて、ルイス Y 抗原陽性癌細胞へ結合する血清 I g はまだ検出できる。最初の追加免疫に続いて、抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 で免疫化した動物において、特異的にルイス Y 抗原陽性癌細胞に結合する血清 I g の途方もなく上昇した抗体価が観察されるが、抗

10

【 0 0 3 7 】

最初の免疫化工程の前および後および最初の追加免疫の前および後の異なったサル血清でも同様の I g の免疫反応のパターンが、ルイス Y 抗原陽性 S K B R 5 細胞の膜調整物への結合実験で証明できる (実験の詳細は実施例 11 参照)。結果は表 2 に要約する。

【 0 0 3 8 】

抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 で免疫化することによりアカゲザルで誘発された液性免疫反応の更なる詳細を更に分析するために、ワクチン処理したサルの異なった血清をセファロースと組み合わせた抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 を導入したカラムで免疫精製した (実験の詳細は実施例 12 参照)。この選択的 - 工程法により、抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 に対する完全な液性免疫反応が、全ての他の妨害血清タンパク質から分離される。最初の実験において、抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 で免疫化したアカゲザルの I g を、最初の免疫化工程の 9 週間後に得られた血清から免疫精製した。第 2 の実験において、抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 で免疫化したアカゲザルの I g を、2 回目の免疫追加の 4 及び 9 週間後に得た溜た血清から免疫精製した。その抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 カラム上での保持を基本にして、得られた I g - フラクシオンは、抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 抗体分子の種々のエピトープに、特異的に結合する。これらの I g - フラクシオンは、抗 - i d B R 5

20

30

【 0 0 3 9 】

2 回目の免疫追加 4 および 9 週間後に得た溜た血清の免疫精製 I g - フラクシオンおよび抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 のエスケーパーフラクシオンの結合を測定した (実験の詳細は、実施例 13 参照)。免疫精製 I g - フラクシオンは、強く抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 に結合するが、エスケーパーフラクシオンでは結合は検出されない。この結果により、本免疫精製法の選択性および効力が証明される (結果は図 2 1 に示す)。

40

【 0 0 4 0 】

次に、2 回目の免疫追加 4 および 9 週間後に得た溜た血清の免疫精製 I g - フラクシオンおよびエスケーパーフラクシオンおよび親マウス M a b (A B 1) の人化変形の結合特性を、S K B R 5 乳癌細胞で比較した。本人化 A B 1 変形 (B R 5 5 - 2 / 人化 I g G 1) を、アカゲザル I g (非常に緊密に関連するアカゲザル I g にまた結合するヤギ - 抗 - 人 - I g / ペルオキシダーゼ) の検出にまた使用した同じ試薬で検出できるため、比較を容易にするために選択した。ほとんど全ての癌細胞結合反応性は、免疫精製 I g - フラクシオン中で促進される。この結果により、抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 の免疫化により誘発されたアカゲザル I g とルイス Y 抗原陽性癌細胞系の交差反応性が証明される。更に、重量

50

を基本にして、免疫精製 I g - フラクシオンの結合強度は、B R 5 5 - 2 / 人化 I g G 1 (A B 1) より僅か 5 倍少ないだけである。免疫精製 I g - フラクシオンのある部分のみが抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 の結合領域を指向し、本ネットワーク理論に従うとこの部分のみが A B 1 と同等な結合特性を有することを考慮に入れると、この結果は注目すべきである。アカゲザル血清の免疫親和性精製の収率を基にして、免疫精製 I g - フラクシオンの抗体価量は約 2 0 0 μ g / ml 血清であり、B R 5 5 - 2 / 人化 I g G 1 と同等な癌細胞結合特性の I g の約 4 0 μ g / ml に対応する (結果は図 2 2 に示し、実験の詳細は実施例 1 0 および 1 2 参照)。

【 0 0 4 1 】

免疫精製サル I g (A B 3) と B R 5 5 - 2 / 人化 I g G 1 のルイス Y 陽性乳癌細胞系 S K B R 5 およびルイス Y 陰性メラノーマ細胞系 W M 9 に対する結合特性の比較を図 2 3 に示す (実験の詳細は実施例 1 0 参照)。A B 3 フラクシオンおよび B R 5 5 - 2 / 人化 I g G 1 の両方が上記のルイス Y 陽性細胞系に強く結合するが、両方の抗体はルイス Y 陰性細胞系には特異的に結合しない。これらの結果により、A B 3 - フラクシオンおよび人化 A B 1 変形の結合パターンの類似性が証明される。

【 0 0 4 2 】

A B 3 - フラクシオンの同様な免疫反応性のパターンは、ルイス Y 陽性 S K B R 5 細胞系およびルイス Y 陰性細胞系 W M 9 の膜フラクシオンを使用した E L I S A によりまた観察される。A B 3 - フラクシオンの実質的な結合は、ルイス Y 陽性細胞膜に対してのみ検出される (結果は図 2 4 に示し、実験の詳細は実施例 1 1 参照)。

【 0 0 4 3 】

免疫精製サル I g (A B 3) の結合特性は、更に数種のルイス Y 陽性人癌細胞系 (小細胞肺癌、胃癌、大腸癌、乳癌) で実証された。免疫精製サル I g は、試験した細胞系に強く結合する (結果は図 2 5 に示し、実験の詳細は実施例 1 0 参照)。

【 0 0 4 4 】

A B 1 抗体 B R 5 5 - 2 / マウス I g G 3 は、癌細胞への結合に続いて、人工エフェクター機構の活性化を経由した癌細胞破壊を媒介する。抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 で免疫化して誘発したアカゲザル I g の癌細胞破壊の能力を試験するために、免疫精製サル I g (A B 3) を使用した。この実験のために、A B 3 - フラクシオンを最初の抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 による免疫化工程の 9 週間後に得たアカゲザルの血清から免疫精製した (上記参照)。この A B 3 - フラクシオンを、人 P B M C をエフェクター細胞として使用した A D C C 実験において、B R 5 5 - 2 / マウス I g G 3 (A B 1) と比較した (結果は図 2 6 に示し、実験の詳細は実施例 1 4 参照)。免疫精製 A B 3 - フラクシオンは、高濃度で、人工エフェクター細胞の活性化による癌細胞破壊を、マウス A B 1 と同等に媒介する。この結果により、抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 でのワクチン処理による選択的癌細胞細胞毒性の示唆が証明される。免疫精製 I g - フラクシオンのある部分のみしか、抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 の結合領域を指向せず、この部分が癌細胞に結合し、A D C C を媒介すると思われるため、高濃度の A B 3 が必要である。

【 0 0 4 5 】

導入部で述べたように、ルイス Y 炭化水素抗原はまた H I V に感染した人白血球上に発現することが知られている。抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 または非特異的マウス I g G 1 で免疫化したアカゲザルの血清 I g の H I V 感染細胞に対する結合行動を調べるため、最初の免疫化工程前および 9 週間後に得られたサル血清を、人血清中の H I V - 陽性を検出するために作られた商業的に入手可能な試験キットで試験した。本試験は、抗 - 人 I g G - F I T C を使用した間接免疫蛍光により検出された人血清 I g の H I V - 感染人 T 細胞系 P A L L へ結合する能力を基本にしている。人およびアカゲザルの I g の大きな類似性のため、試験キットの本来の試薬はまたアカゲザル I g にも適応できる。非感染 P A L L 細胞への結合を対照として使用する (実験の詳細は実施例 1 5 参照)。

【 0 0 4 6 】

正常アカゲザル血清では、H I V 感染および非感染 P A L L 細胞の両方のバックグラウ

ンド免疫蛍光は、正常人血清で検出されたバックグラウンド免疫蛍光より僅かに高い。しかしながら、抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 で免疫化したアカゲザルの血清 I g のみが H I V - 感染 P A L L 細胞と実質的に結合するが、非感染 P A L L 細胞への結合はほとんど全く検出されない。非特異的マウス - I g G 1 で免疫化したアカゲザルの血清 I g の H I V - 感染 P A L L 細胞に対する反応性は、明らかにあまり促進されておらず、正常サル血清で見られるバックグラウンドの免疫蛍光と非常に近い(結果は表 3 に要約する)。

【 0 0 4 7 】

抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 で免疫化したアカゲザルの I g は、2 回目の免疫追加の 4 及び 9 週間後に得た貯蔵血清から、抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 カラム(上記参照)を使用して免疫精製した。本免疫精製 I g (A B 3)の結合特性を、B R 5 5 - 2 / マウス I g G 3 (A B 1)と、既に述べた人血清中の H I V - 血清陽性を検出するために設計された商業的に入手可能な試験キット中で比較した(実験の詳細は実施例 1 5 参照)。免疫精製 I g - フラクション(A B 3)は選択的に H I V - 感染 P A L L 細胞に結合するが、非感染 P A L L 細胞への結合は検出されない。同様な結合パターンが B R 5 5 - 2 / マウス I g G 3 (A B 1)で見られる。これらの結果は表 4 に要約する。

10

【 0 0 4 8 】

種々の癌および H I V が原因である疾病の予防および処置のための独特なワクチンとしての使用に加えて、本発明で記載の B R 5 5 - 2 の結合領域に対して発生した内部像抗 - イディオタイプ M a b は、B R 5 5 - 2 への結合特性を有するモノクローナル抗体、その誘導体または断片の定量的測定の有効な道具である。例えば、人血清中の全てのマウスの B R 5 5 - 2 のサブタイプの濃度を選択的に測定するのに使用できる。B R 5 5 - 2 の結合領域の三次元構造の認識のため、これらの抗 - i d M a b は免疫反応性 B R 5 5 - 2 構造のみに結合する。この特性は、既知の抗 - 定常領域剤を基本にしたものより優れた検出系を導く。免疫反応性 B R 5 5 - 2 / マウス I g G 3 または B R 5 5 - 2 / マウス I g G 2 a の定量的測定のための E L I S A 系は、実施例 1 6 に記載され、人血清中の M a b の典型的な標準曲線は図 2 7 に示す。

20

【 0 0 4 9 】

本発明で記載の抗 - i d M a b を基にした同様な E L I S A 系が、人血清中の B R 5 5 - 2 の免疫反応性マウス/人キメラの高度に選択的な定量的測定に適用できる。これらのキメラは B R 5 5 - 2 の可変領域および人定常領域からなる(例えば人 I g G 1 または人 I g G 3)。人血清中での大量に過剰な正常人 I g のため(> 1 0 mg/ml)、このようなマウス/人キメラは、血清に存在する任意の人 I g に結合する既知の抗 - 人 - F c 剤を使用して人血清中では検出できない。選択的 E L I S A 系は実施例 1 7 および 1 8 に記載し、人血清中での典型的な標準曲線は図 2 8 および 2 9 に示す。

30

【 0 0 5 0 】

完全に人化した B R 5 5 - 2 の変異体は、マウス親 M a b の相補性決定領域(C D R)を、人のフレームワークおよび定常領域へ融合させることにより構築する。コンピューター造形的手段により、選択した人フレームワークのある点変異が、親マウス M a b と比較してリス Y 陽性癌細胞に対する結合親和性を実質的に損失しない人化変異体を導く。従って、本来のマウスアミノ酸配列の少しの部分のみのこれらの人化変異体は、結合特性が未変化で残っていることを測定する。著しく、本発明で記載の全ての抗 - i d B R 5 5 - 2 M a b はまたこれらの親マウス I g G 3 M a b の人化 I g G 1 変異体のイディオタイプに強く結合する。抗 - i d M a b の A B 1 人化変異体への結合行動は、上記のマウス/人キメラ M a b と同等である。これは、ファルマシアの B I A c o r e (商標)系を使用した生物特異的相互作用分析により証明される。殆どの場合、高濃度で、抗 - i d B R 5 5 - 2 および B R 5 5 - 2 / キメラ人 I g G または B R 5 5 - 2 / 人化 I g G 1 の間で殆ど 1 : 1 化学量論が観察される。実験の詳細は実施例 1 9 に示し、抗体価曲線は図 3 0 - 3 5 に示す。これらの発見は抗 - i d M a b の、全ての B R 5 5 - 2 の変異体の超可変領域の無傷三次元形への結合の結合特性およびその内部像特性を証明する最重要点である。

40

【 0 0 5 1 】

50

この独特および選択的認識パターンを基にして、抗 - i d B R 5 5 - 2 M a b はまた、人血清中で、血清中に存在する大過剰の人免疫グロブリンにもかかわらず、B R 5 5 - 2 に特性を有する免疫反応性人化抗体の高度に選択的定量測定に使用できる。同じ E L I S A 系がまたサル血清中での B R 5 5 - 2 に特性を有する人化抗体の定量的測定に有用である。例えば、人化 B R 5 5 - 2 M a b の受動免疫治療のための、前臨床開発間に必要なサル毒性および薬物動態の研究に非常に重要である。E L I S A 系は実施例 2 0 に記載し、人血清における典型的標準曲線は図 3 6 に示す。

【 0 0 5 2 】

B R 5 5 - 2 全ての変異体の抗 - i d B R 5 5 - 2 M a b による結合領域の認識はまた B R 5 5 - 2 / マウス I g G 3 の抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 への結合を B R 5 5 - 2 / キメラ人 I g G 1 および B R 5 5 - 2 / キメラ人 I g G 3 と比較することにより証明される。両方のキメラは、一定量の親マウス M a b の抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 への結合を用量依存的に競合阻害する。この競合 E L I S A は実施例 2 1 に記載し、結果は図 3 7 に示す。

10

【 0 0 5 3 】

B R 5 5 - 2 / マウス I g G 3 の抗原陽性癌細胞系への結合は、補体媒介破壊に必須である。従って、癌細胞毒性の抗 - i d B R 5 5 - 2 M a b による阻害は、A b 1 の細胞表面上のその抗原への結合を阻止する能力を反映する。S K B R 5 人乳癌細胞系に対する B R 5 5 - 2 / マウス I g G 3 により媒介された補体依存細胞毒性の抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 による有効な中和を図 3 8 に示し、実験の詳細は実施例 2 2 参照。

20

【 0 0 5 4 】

B R 5 5 - 2 の無傷結合領域の全ての構造の非常に特異的な認識のため、抗 - i d B R 5 5 - 2 M a b は、全ての B R 5 5 - 2 の変異体の単一工程免疫精製法に使用できる。抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 は C H - セファロース 4 B と結合する。この免疫親和性材料は、例えばインビトロで培養された B R 5 5 - 2 / キメラ人 I g G 1 の直接の精製に使用できる。キメラ M a b は、純度 > 9 5 % で、収率 7 5 % で得られた。非常に選択性のため、本免疫精製法はプロテイン A を使用した親和性精製より優れている。実験の詳細は実施例 2 3、S D S - P A G E は図 3 9 に示す。不純物は検出されない。同じ方法が、同様の好結果で、C D R の移植により得た B R 5 5 - 2 の人化変異体の細胞培養上清の非常に有効な一工程精製に適応できる。

30

【 0 0 5 5 】

結論として、ウサギおよびアカゲザルのマウスモノクローナル I g G 1 抗 - イディオタイプ抗体による B R 5 5 - 2 (抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4) に特性を有する抗体のイディオタイプに対する免疫化は、ルイス Y 陽性人癌細胞に特異的に結合する高い抗体価免疫反応を導く。アカゲザルの実験で証明されるように、反復追加免疫化により、抗 - 癌免疫性が数年維持される。これらの免疫化により人工フェクター細胞存在下で誘発された I g は、癌細胞毒性を A D C C 中で示す。抗 - i d 免疫化の特異性は、アカゲザルの対照群の非特異的マウス I g G 1 による免疫化により証明される。非特異的マウス I g G 1 に対する実質的免疫反応にもかかわらず、任意の種類 of 癌細胞への特異的結合は検出されない。

【 0 0 5 6 】

これらの結果により、人における保護的抗癌免疫性の誘発を目的とする治療および予防的活性免疫化のための抗 - i d B R 5 5 - 2 M a b のルイス Y 癌関連抗原の代替物としての使用は、最重要点である。

40

【 0 0 5 7 】

更に、アカゲザルの抗 - i d B R 5 5 - 2 M a b による免疫化は、選択的に H I V - 感染陽性細胞に特異的にまた結合する高い抗体価免疫反応を導く。これらの細胞は、ルイス Y を発現することが知られている。比較して、アカゲザルの非特異的マウス I g G 1 による免疫化は、H I V - 陽性または陰性細胞への特異的結合を導かない。

【 0 0 5 8 】

これらの結果から、H I V および H I V 感染が原因である疾病の保護的免疫性の誘発を

50

目的とする治療および予防的ワクチン処理のための抗 - i d B R 5 5 - 2 M a b のルイス Y 炭水化物抗原の代替物としての使用は、最重要点である。

【 0 0 5 9 】

抗 - i d B R 5 5 - 2 M a b の予防的および治療的ワクチンとしての使用に加えて、これらの内部像抗 - i d M a b は、血清中または他の体液中におけるキメラおよび人化変異体を含む B R 5 5 - 2 に特異性を有する分子の、非常に選択的および定量的測定に有用な試薬である。好適なマトリックスと共有結合したこれらの抗 - i d M a b は、B R 5 5 - 2 に特異性を有するすべての分子の高収率で非常に選択的な単一工程免疫親和性精製にまた使用できる。

【 0 0 6 0 】

以下の実施例は本発明を説明する。略語は以下の意味を有する：

| | | |
|-------------------|--|----|
| A D C C : | 抗体依存性細胞性細胞毒性 | |
| B S A : | 牛血清アルブミン | |
| C D C : | 補体依存細胞毒性 | |
| D M E M : | ダルベッコ修飾イーグル培地 | |
| E D C : | N - エチル - N ' - (3 - ジメチルアミノプロピル)カルボジイ ミドヒドロクロリド | |
| E L I S A : | 酵素結合免疫吸着測定 | |
| F C S : | 牛胎児血清 | |
| H B S : | ヘPes緩衝化食塩水 | 20 |
| M a b : | モノクローナル抗体 | |
| N H S : | N - ヒドロキシサクシンイミド | |
| P B M S : | 末梢血単核細胞 | |
| P B S : | リン酸緩衝化食塩水 | |
| R A M - I g G 1 : | ウサギ抗マウス I g G 1 免疫グロブリン | |
| R P M I : | ロスウェル・パーク・メモリアル・インスティテュート | |
| S D S : | ドデシル硫酸ナトリウム | |
| K L H : | キーホルリンペットヘモシアニン | |
| S P D P : | N - サクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジル - ジチオプロピオン酸) | 30 |
| P A G E : | ポリアクリルアミドゲル電気泳動 | |
| I E F : | 等電点電気泳動 | |
| P E G : | ポリエチレングリコール | |
| F I T C : | フルオリンイソチオシアネート | |
| I F A : | 免疫蛍光測定。 | |

【 0 0 6 1 】

実施例中で記載される材料は以下の通りである：

マイクロタイタープレート：イムノプレート II (ヌンク)

細胞系：

| | | |
|-------------|--|----|
| S K B R 5 : | 人乳癌細胞系 | 40 |
| C A T O : | 人胃癌細胞系 | |
| S W 9 4 8 : | 人大腸癌細胞系 | |
| S W 2 : | 人小細胞肺癌系 | |
| W M 9 : | 人メラノーマ細胞系 | |
| P A L L : | 人 T - 細胞系 | |
| S P 2 : | マウスミエローマ細胞系 | |
| 培地 A : | R P M I 1 6 4 0 + 2 g / l N a H C O ₃ 1 0 0 U / ml ペニシリン G 1 0 0 μ g / ml 硫酸ストレプトマイシン 4 mM グルタミン | 50 |

| | | |
|-------------|---|----|
| 培地 B : | 10% FCS (熱不活性、 - グロブリン - 不存在) RPMI 1640 + 2 g / l NaHCO ₃ 100 U / ml ペニシリン G 100 μg / ml 硫酸ストレプトマイシン 4 mM グルタミン | |
| 培地 C : | 10% FCS (熱不活性) DMEM 10% NCTC - 135 (合成培地、ギブコ) 1% MEM 必須アミノ酸 (ギブコ) 0.5% ピルビン酸ナトリウム 0.5% オキサロ酢酸 (シグマ) 20% 熱不活性 FCS 4 mM グルタミン 100 U / ml ペニシリン G 100 μg / ml 硫酸ストレプトマイシン | 10 |
| 培地 D : | 培地 C + 1.36 mg / l ヒポキサンチン 0.39 mg / l チミジン | |
| 培地 E : | 培地 D + 0.4 mg / l アミノプテリン | |
| 培地 F : | 培地 C + マウス胸腺細胞 (25 ml 培地 C に懸濁した一匹の Balb / c マウスの胸腺細胞) | 20 |
| 培地 G : | DMEM 10% 熱不活性 FCS 4 mM グルタミン 100 U / ml ペニシリン G 100 μg / ml 硫酸ストレプトマイシン | |
| 培地 H : | 10 mM N - (2 - ヒドロキシエチル)ピペラジン - N' - エタン スルホン酸 3.4 mM エチレンジニトロテトラ酢酸 0.15 M NaCl 0.005% P20 (ファルマシア・バイオセンサー・アクチエ ボラーク、ウブサラ、スウェーデン) | 30 |
| PEG : | ポリ - エチレン - グリコール (MW = 3400) 1 g が 1 ml DMEM に溶解 | |
| PBS 欠乏 : | 138.0 mM NaCl 1.5 mM KOH 2.7 mM KCl 6.5 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7.2 | |
| コーティング緩衝液 : | 15 mM Na ₂ CO ₃ 35 mM NaHCO ₃ 3 mM NaN ₃ pH 9.6 | 40 |
| 染色緩衝液 : | 24.3 mM クエン酸 51.4 mM Na ₂ HPO ₄ pH 5.0 | |
| 洗浄用緩衝液 : | PBS 欠乏中 2% NaCl 0.2% トリトン X - 100 | |
| 基質溶液 : | 40 mg o - フェニレンジアミンジヒドロクロリド 100 ml 染色緩衝液 | 50 |

結合緩衝液： 20 μ l H₂O₂ 30%
 0.1 M トリス / HCl
 0.2 M NaCl
 pH 7.5

溶出緩衝液： 0.15 M グリシン / HCl
 0.2 M NaCl
 pH 2.8

連結緩衝液： 0.1 M NaHCO₃
 0.5 M NaCl
 pH 8.0

10

【実施例】

【0062】

実施例 1：抗-idBR55-2 Mab の発生

1.1：マウスの免疫化

Balb/c マウスを各々、SPDP を経由してKLH と組み合わせたBR55-2 / マウスIgG3 のF(ab')₂-断片100 μ lで、記載のように(ジェー・カルソンら、バイオケミカル・ジャーナル、173、723、1978)、以下の計画の腹腔内注射により免疫化する：

0日：接合体100 μ g(PBS 欠乏中1mg/ml) + フロイド完全アジュバント100 μ l

20

7および28日：接合体100 μ g(PBS 欠乏中1mg/ml) + フロイド不完全アジュバント100 μ l

【0063】

最初の免疫化i.v.の8、9、10および11日後、全4回の追加免疫(各々PBS 欠乏中100 μ l中接合体100 μ g)を与える。12日に脾臓を無菌的に取り出し、PBS 欠乏に懸濁し、3回PBS 欠乏で洗浄する。

【0064】

1.2：ハイブリダイゼーション

これらの脾臓細胞をSP2/0細胞懸濁液中に1：1の比で加え、900gで5分遠心する。PEG-溶液1ml(37)を細胞ペレットに1分以内に滴下し、PBS 欠乏1ml(37)で翌分以内に希釈する。培地C 10mlを穏やかに攪拌しながら加え、懸濁液をPBS 欠乏で50mlに希釈する。懸濁液を800gで5分遠心し、ペレットを培地Dに再懸濁し、細胞をマイクロタイタープレート(ヌンク96)のウェルに、 2.5×10^5 細胞/ウェルの濃度で移す。一晚、37、5%CO₂でのインキュベーションの後、培地E 100 μ l/ウェルを加える。72時間後および4日毎に培地を新しい培地Dに代える。

30

【0065】

実施例 2：ハイブリドーマ上清中のマウスIgGの定量的測定

ウサギ-抗-マウス-IgG(ノルディック試薬のようなもの：コーティング緩衝液中1：1000)の100 μ lのアリコートマイクロタイタープレートのウェルに加え、37 で60分インキュベーションする。プレートを6回洗浄用緩衝液で洗浄し、PBS 欠乏/5%FCS 200 μ lを加え、30分、37 でインキュベーションする。プレートを上記のように洗浄する。培養2週間後に得られたハイブリドーマ上清の100 μ lのアリコートに加え、プレートを37 で60分インキュベーションする。非結合抗体を上記のように洗い出し、ペルオキシダーゼ-結合抗体(ディアノヴァの試薬のようなウサギ-抗-マウス-IgG/ペルオキシダーゼ；PBS/2%FCS中1：1000)の100 μ lのアリコートを加える。30分、37 でインキュベーションの後、プレートを4回洗浄用緩衝液、2回染色緩衝液で洗浄する。基質溶液の100 μ lのアリコートを加え、色の濃くなるのを5分後に4N H₂SO₄の50 μ lのアリコートを加えることにより停止させる。光学的励起を492nmで測定する(参考測定620nm)。

40

【0066】

50

実施例 3 : ハイブリドーマ上清 - I g G の B R 5 5 - 2 F (a b ')₂ - 断片に対する特異的結合 (E L I S A)

十分なマウス I g G (即ち培地ブランクより 1 0 倍以上光学密度が高い)を産生するハイブリドーマを、培地 F 中の単一細胞培養にサブクローン化し、培地 C 内で更に 2 週間培養する。上清を、B R 5 5 - 2 の F (a b ') - 断片 (1 0 μ g / m l ; コーティング緩衝液中の希釈)の 1 0 0 μ l のアリコートを使用して実施例 2 に記載のように試験する。

【 0 0 6 7 】

実施例 4 : B R 5 5 - 2 / マウス I g G 2 a の S K B R 5 人乳癌細胞への結合のハイブリドーマ上清 - I g G による阻害 (細胞 - E L I S A)

上記測定で陽性の全てのハイブリドーマ上清を、以下のように試験する :

マイクロタイプレートをポリ - L - リジンヒドロプロミド (2 0 - 3 0 k D ; P B S 欠乏中 2 0 μ g / m l ; 1 0 0 μ l / ウェル ; 3 0 分、室温)で予備処理し、2 回 P B S 欠乏 (2 0 0 μ l / ウェル)で洗浄し、次いで、培地 B 中の S K B R 5 細胞懸濁液 (4 × 1 0⁶ 細胞 / m l) 5 0 μ l / ウェルと共に一晩 4 ° C でインキュベーションする。上清を除去した後、5 0 μ l グルタルジアルデヒド / ウェル (生理食塩水中 0 . 1 %) で 5 分間、室温で固定し、上清を除去し、細胞を P B S 欠乏 / 1 % B S A / 0 . 1 % N a N₃ 2 0 0 μ l / ウェル中に再懸濁し、1 時間室温に置く。上清を除去し、プレートを 2 回 0 . 0 5 % トウイン 2 0 含有 P B S 2 0 0 μ l / ウェルで洗浄する。

【 0 0 6 8 】

1 μ g / m l マウス - I g G に調整したハイブリドーマ上清を 1 0 倍過剰の非特異的マウス - I g G と共に 3 0 分、3 7 ° C でインキュベーションする。これらのサンプルを 0 . 5 μ g / m l B R 5 5 - 2 / マウス I g G 2 a と共に 3 0 分、3 7 ° C でインキュベーションする。本混合物 1 0 0 μ l を細胞に加え、プレートを 1 時間、3 7 ° C でインキュベーションする。

【 0 0 6 9 】

混合物の後処理 : 非結合抗体を 2 回 1 0 0 μ l / ウェル氷冷 0 . 0 5 % トウイン 2 0 含有 P B S で洗い出す。ペルオキシダーゼ - 結合抗体 (ツイメッド試薬のようなウサギ - 抗 - マウス I g G 2 a / ペルオキシダーゼ ; P B S 欠乏 / 2 % F C S 中 1 : 1 0 0 0) の 1 0 0 μ l のアリコートを加える。4 5 分、3 7 ° C でインキュベーションした後、ウェルを 3 回上記 P B S / トウイン 2 0 溶液で洗浄し、次いで基質溶液 1 0 0 μ l を各々のウェルに加える。5 分後、色の濃くなるのを 4 N H₂ S O₄ を加えることにより停止させる。抗体の細胞への結合を 4 9 2 n m の光学的励起を測定することにより決定する (参考測定 6 2 0 n m) 。

【 0 0 7 0 】

実施例 5 : 抗 - i d B R 5 5 - 2 M a b の免疫親和精製

5 . 1 : B R 5 5 - 2 / マウス I g G 2 a セファロースの調製

凍結乾燥活性化 C H - セファロース 4 B 1 0 g を 1 m M H C l に懸濁し、焼結ガラスフィルターに移し、1 m M H C l 2 l で 1 5 分洗浄する。配位子 (B R 5 5 - 2 / マウス I g G 2 a 1 2 0 m g) を連結緩衝液 5 0 m l に溶解し、栓をした容器内で洗浄したゲルと混合し、1 時間室温でくるくる回転させる。ゲルを連結緩衝液で洗浄し、1 時間 1 M エタノールアミン 5 0 m l とインキュベーションし、残存活性基を遮断する。次いで、親和性収着媒を交互の p H で 3 サイクル洗浄する。各々のサイクルは、p H 4 (0 . 1 M 酢酸、0 . 5 M N a C l) での洗浄、続く p H 8 (0 . 1 M トリス、0 . 5 M N a C l) での洗浄から成る。

【 0 0 7 1 】

5 . 2 : 抗 - i d B R 5 5 - 2 M a b の単離

クロマトグラフィーを 4 ° C で行う。カラム (B I O R E X M P カラム直径 1 . 5 c m) を M a b B R 5 5 - 2 / マウス I g G 2 a セファロース (容量 3 5 m l) で満たす。ゲルを結合緩衝液および溶出緩衝液で洗浄する。結合緩衝液による平衡化の後、抗 - i d B R 5 5 - 2 含有条件媒質をカラムに流速 1 5 m l / 分でかける。エスケーパーフラクションの溶出

10

20

30

40

50

の後、結合抗 - i d B R 5 5 - 2 が溶出緩衝液と共に脱着し、脱着後すぐに 1 M トリス / H C l 緩衝液、p H 7 . 5 で中和する。

【 0 0 7 2 】

5.3 : 抗 - i d B R 5 5 - 2 M a b の濃縮

溶出抗体溶液 (0 . 1 2 mg / ml) の濃縮を、P M 1 0 ジアフロ膜を使用した攪拌アミコン超濾過セル中で行う。I g G に対する溶質拒否は 9 8 % 以上であり、I g G の最終濃縮は 3 . 7 mg / ml である。

【 0 0 7 3 】

実施例 6 : 精製抗 - i d B R 5 5 - 2 M a b の特徴付け

6.1 : M o n o - Q イオン交換クロマトグラフィー

カラム : M o n o - Q H R 5 / 5 (ファルマシア)
 緩衝液 A : 2 0 mM トリエタノールアミン、p H 7 . 7
 緩衝液 B : 2 0 mM トリエタノールアミン、1 M N a C l 、p H 7 . 7
 流速 : 1 ml / 分
 検出 : U V 2 8 0 nm
 勾配 : 直線 2 % / 分
 結果 : 全ての抗 - i d B R 5 5 - 2 M a b において > 9 5 % 純度と分かった

10

【 0 0 7 4 】

6.2 : 高速サイズ排除クロマトグラフィー

カラム : ゴルボックス G F 2 5 0 、 9 . 4 × 2 5 0 mm
 緩衝液 : 0 . 1 M リン酸ナトリウム、0 . 2 M N a C l 、p H 7 . 0
 流速 : 1 ml / 分
 検出 : U V 2 8 0 nm
 結果 : 全ての抗 - i d B R 5 5 - 2 M a b において > 9 5 % 純度と分かった

20

【 0 0 7 5 】

6.3 : S D S - P A G E

実験は、1 0 % アクリルアミドゲルを使用して、レミリーの方法に従って、還元および非還元の両方で行う。不純物は検出されない (結果は図 1 に示す)。

【 0 0 7 6 】

6.4 : 等電点電気泳動

分析は、p H 勾配 3 - 9 (ファストゲル I E F 3 - 9) を使用してファスト - システム (ファルマシア) および銀染色で行う (結果は図 2 に示す)。

30

【 0 0 7 7 】

実施例 7 : B R 5 5 - 2 / マウス I g G 3 の S K B R 5 細胞系への結合 (細胞 - E L I S A) - 精製抗 - i d M a b による阻害

マイクロタイプレートの予備処理を実施例 4 に記載のように行う。各々抗 - i d B R 5 5 - 2 M a b を 2 % F C S 含有 P B S 欠乏で希釈する (1 0 から 0 . 5 μ g / ml) 。各々のこれらの希釈に、1 μ g / ml B R 5 5 - 2 / マウス I g G 3 を加える。本混合物の 1 0 0 μ l を細胞に加え、プレートを 1 時間、3 7 ° C でインキュベーションする。本混合物を実施例 4 に記載のようによく後処理する。B R 5 5 - 2 / マウス I g G 3 の細胞への結合の程度を 4 9 2 nm の光学的励起を測定することにより決定する (参考測定 6 2 0 nm) 。

40

【 0 0 7 8 】

実施例 8 : 抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 によるウサギおよびアカゲザルの免疫化

8.1 : 抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 によるウサギの免疫化

3 匹の雌チンチラウサギを、水酸化アルミニウムに吸着した抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 (抗体 1 mg + A l (O H) ₃ 3 . 3 mg / P B S 欠乏 ml) 3 0 0 μ g の皮内投与により、1、8、1 5 および 3 6 日に免疫化する。3 匹のウサギを、陰性対照として、同様の条件下、同量の非特異的マウス - I g G 1 で免疫化する。血清を免疫化前および最初の免疫 9 週間後に回収する。

【 0 0 7 9 】

50

8.2 : 抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 によるアカゲザルの免疫化

3匹アカゲザルを、水酸化アルミニウムに吸着した抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 (抗体 1 mg + A l (O H) ₃ 3.3 mg / P B S 欠乏 ml) 0.1 mg / kg の皮下 (s.c.) 投与により、1、8、15 および 36 日に免疫化する。2匹のアカゲザルを、陰性対照として、同様の条件下、同量の非特異的マウス - I g G 1 で免疫化する。血清を免疫化前および最初の免疫 4 および 9 週間後に回収する。

【 0 0 8 0 】

最初の免疫化過程の 2 年後、同じサルは、各々抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 または非特異的マウス - I g G (上記と同量および同製剤) の最初の追加免疫注射を受ける。血清を最初の追加免疫化の前および 1 および 4 週間後に集める。

最初の免疫化過程の 3 年後 (= 最初の追加免疫注射の 1 年後)、同じサルは、各々抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 または非特異的マウス - I g G (上記と同量および同製剤) の 2 回目の追加免疫注射を受ける。血清を 2 回目の追加免疫化の前および 1、4 および 9 週間後に集める。

【 0 0 8 1 】

実施例 9 : S K B R 5 または W M 9 細胞系へのウサギ血清 I g の結合 (細胞 - E L I S A)
マイクロタイタープレートの前処理は実施例 4 に記載のように行う。好適な予備希釈したウサギ血清の 100 μ l のアリコートを経細胞に加え、プレートを 37 で 1 時間インキュベーションする。抗体の細胞への結合を、492 nm の励起を測定することにより決定する (参考測定 620 nm)。

実施例 10 : S K B R 5、C A T O、S W 9 4 8、S W 2 および W M 9 人癌細胞系へのアカゲザル血清 I g または免疫精製 I g (A B 3) の結合 (細胞 - E L I S A)

【 0 0 8 2 】

マイクロタイタープレートの前処理は実施例 4 に記載のように行う。好適な予備希釈したアカゲザル血清 I g または免疫精製アカゲザル I g (実施例 12 をまた参考) および対照として B R 5 5 - 2 人化 I g G 1 の 100 μ l のアリコートを経細胞に加え、プレートを 37 で 1 時間インキュベーションする。混合物を実施例 4 に記載のようによく後処理する。抗体の細胞への結合を、492 nm の励起を測定することにより決定する (参考測定 620 nm)。

【 0 0 8 3 】

実施例 11 : アカゲザル血清 I g または免疫精製 I g (A B 3) の S K B R 5 - または W M 9 - 癌細胞 - 膜調製物への結合 (E L I S A)

ルイス Y 抗原陽性 S K B R 5 人乳癌細胞系およびルイス Y 陰性 W M 9 メラノーマ細胞系の膜を、ディー・トムら、バイオケミカル・ジャーナル、168、187 - 194 (1977) に記載のようによく調製した。各々の膜調製物 (10 μ g / ml ; コーティング緩衝液中希釈) の 100 μ l のアリコートを経マイクロタイタープレートのウェルに加え、+4 で一晩インキュベーションする。プレートを 4 回洗浄用緩衝液で洗浄し、P B S 欠乏 / 5 % F C S 200 μ l を加え、30 分、37 でインキュベーションする。プレートを上記のようによく洗浄する。P B S 欠乏 / 2 % F C S 中、好適な希釈のアカゲザル血清または免疫精製アカゲザル I g (2 をまた参照) の 100 μ l のアリコートを加え、プレートを 60 分、37 でインキュベーションする。非結合抗体を上記のようによく洗い出し、ペルオキシダーゼ - 結合抗体 (ケミコン & コーポレイテッドの試薬のようなヤギ - 抗 - 人 - I g / ペルオキシダーゼ、P B S / 2 % F C S 中 1 : 1000) の 100 μ l のアリコートを加える。30 分、37 でインキュベーションの後、プレートを 2 回洗浄用緩衝液、2 回染色緩衝液で洗浄する。

【 0 0 8 4 】

基質溶液 100 μ l のアリコートを加え、5 分後、色の濃くなるのを 4 N H ₂ S O ₄ の 50 μ l のアリコートを加えることにより停止させる。光学密度 (O D) を 492 nm で測定する (参考測定 620 nm)。

【 0 0 8 5 】

10

20

30

40

50

実施例 12 : 抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 (A B 3) で免疫化したアカゲザルの血清 I g の抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 - セファロースを使用した免疫親和精製

12.1 : 抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 - セファロースの調製

凍結乾燥活性化 C H - セファロース 4 B 9 g を 1 m M H C l に懸濁し、焼結ガラスフィルターに移し、1 m M H C l 2 l で 1 5 分洗浄する。配位子 (抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 9 5 m g) を連結緩衝液 5 0 m l に溶解し、栓をした容器内で洗浄したゲルと混合し、1 時間室温でくるくる回転させる。ゲルを連結緩衝液で洗浄し、1 時間 1 M エタノールアミン 5 0 m l とインキュベーションし、残存活性基を遮断する。次いで、親和性収着媒を交互の p H で 3 サイクル洗浄する。各々のサイクルは、p H 4 (0 . 1 M 酢酸、0 . 5 M N a C l) での洗浄、続く p H 8 (0 . 1 M トリス、0 . 5 M N a C l) での洗浄から成る。

10

【 0 0 8 6 】

12.2 : 抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 で免疫化したアカゲザル血清 I g (A B 3) の単離クロマトグラフィーを 4 で行う。カラム (ファルマシアカラム H R 5 / 2、ベッド容積 5 × 2 5 m m) を抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 - セファロース (容量 0 . 5 m l) で満たす。ゲルを結合緩衝液および溶出緩衝液で洗浄する。出発材料は抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 で免疫化したアカゲザルから、免疫開始 9 週間後に得た血清 2 m l である。他の一連の実験のために、抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 で免疫化したアカゲザルから、2 回目の追加免疫 4 および 9 週間後に得た保存血清 2 m l を使用した。各々の血清を結合緩衝液中 1 : 2 に希釈し、カラムにかける。エスケーパーフラクションの溶出の後、結合アカゲザル免疫グロブリンが溶出緩衝液と共に脱着し、脱着後すぐに 1 M トリス / H C l 緩衝液、p H 7 . 5

20

【 0 0 8 7 】

実施例 13 : 抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 または非特異的マウス I g G 1 で免疫化したアカゲザル血清 I g または免疫精製 I g の抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 への結合 (E L I S A)

抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 (1 0 μ g / m l ; コーティング緩衝液中希釈) の 1 0 0 μ l のアリコートマイクロタイタープレートのウェルに加え、3 7 で 6 0 分インキュベーションする。プレートを 6 回洗浄用緩衝液で洗浄し、P B S 欠乏 / 5 % F C S 2 0 0 μ l を加え、3 0 分、3 7 でインキュベーションする。プレートを上記のように洗浄する。サル血清または免疫精製サル I g を P B S 欠乏 / 2 % F C S 中希釈する。各々のサンプルの 1 0 0 μ l のアリコートマイクロタイタープレートのウェルに加え、プレートを 6 0 分、3 7 でインキュベーションする。非結合抗体を上記のように洗い出し、ペルオキシダーゼ - 結合抗体 (ケミコン & コーポレイテッドの試薬のようなヤギ - 抗 - 人 - I g / ペルオキシダーゼ、P B S / 2 % F C S 中 1 : 1 0 0 0) の 1 0 0 μ l のアリコートを加える。3 0 分、3 7 でインキュベーションの後、プレートを 4 回洗浄用緩衝液、2 回染色緩衝液で洗浄する。基質溶液 1 0 0 μ l のアリコートを加え、5 分後、色の濃くなるのを 4 N H₂ S O₄ の 5 0 μ l のアリコートを加えることにより停止させる。光学密度 (O D) を 4 9 2 n m で測定する (参考測定 6 2 0 n m)。

30

【 0 0 8 8 】

実施例 14 : 人 P B M C を使用した免疫精製サル I g (A B 3) または B R 5 5 - 2 / マウス I g G 3 により媒介される S K B R 5 細胞に対する抗体依存細胞毒性 (A D C C)

40

測定の前日、S K B R 5 細胞を新鮮培地 A に移し、細胞培養フラスコ中で 3 7 / 5 % C O₂ に保つ。

【 0 0 8 9 】

標的細胞の ⁵¹ C r 標識 :

細胞を培養フラスコから回収し、培地 A 8 0 0 μ l 中 5 × 1 0⁶ 細胞の濃度で 3 7 / 5 % C O₂ で 1 時間、1 0 0 μ C i N a₂ ⁵¹ C r O₄ とインキュベーションする。細胞を、次いで培地 A で洗浄し、過剰の ⁵¹ C r を除去し、新鮮培地 A に再懸濁し、その濃度を 2 . 5 × 1 0⁵ 細胞 / m l に調製する。

【 0 0 9 0 】

50

P B M C の単離 :

ヘパリン処理した新鮮人血液 50 ml を 0.1% グルコース含有 P B S 完全 60 ml で希釈する。本溶液の 15 ml のアリコートにフィコール - パーク溶液 15 ml の上に重層し、管を 400 g で 30 から 60 分遠心する。血漿上清を廃棄し、P B M C 層を回収し、P B S 完全 + 0.1% グルコース 50 ml で希釈する。約 80 g (10 分) で遠心後、ペレットを P B S 完全 + 0.1% グルコース 25 - 30 ml に再懸濁し、再遠心 (80 g、10 分) し、ペレットを回収し、培地 A に懸濁し、細胞を計数し、懸濁液を約 2×10^6 から 9×10^6 細胞 / ml となるように培地 A で希釈する。100 μ l のアリコートをマイクロタイタープレートの各々のウェルにピペットで移し、エフェクター細胞を一晩 37 / 5% CO₂ でインキュベーションする。

10

【0091】

A D C C :

⁵¹Cr - 標識標的細胞 100 μ l を予備インキュベーションしたエフェクター細胞に、エフェクター細胞対標的細胞の所望の比で加える。所望の濃度に P B S 欠乏で希釈した免疫精製サル Ig (A B 3) または B R 5 5 - 2 / マウス Ig G 3 50 μ l を加え、プレートを一晩 (約 18 時間) 37 / 5% CO₂ でインキュベーションする。上清をスカトロン - ハーベスティング・プレスで回収し、 γ - カウンターで計数する。これは実験的遊離の値を産生する。全 ⁵¹Cr 遊離は、P B M C を 2% S D S、50 mM Na₂CO₃ および 10 mM E D T A 100 μ l と置き換え、抗体溶液を P B S 欠乏 50 μ l と置き換えることにより上記のように決定する。自然 ⁵¹Cr 遊離は P B M C を培地 A 100 μ l と置き換え、抗体溶液を P B S 欠乏 50 μ l と置き換えて得る。

20

【0092】

計数後、結果を以下のように計算する :

実験的遊離 - 自然遊離

溶解 % = $\frac{\text{実験的遊離} - \text{自然遊離}}{\text{全遊離} - \text{自然遊離}} \times 100$

【0093】

実施例 15 : H I V - 感染 / 非感染 P A L L - 細胞へのアカゲザル血清、免疫精製アカゲザル Ig または B R 5 5 - 2 / マウス Ig G 3 の結合 (間接的免疫蛍光測定、I F A - 抗 - H I V 1 - キット、バルドハイム)

30

商業的に入手可能な免疫蛍光測定キット (バルドハイム & コーポレイテッド ; H I V 血清陽性を決定するために購入) において、H I V - 感染および非感染 P A L L 細胞 (人 T 細胞系) をスライドに固定する。実験方法は本質的に提供者のガイドラインに従う。1% B S A と共に 30 分、37 でインキュベーションした後、スライドをアカゲザル血清 (濃縮および P B S 欠乏中 1 : 10 希釈) または正常人血清中で希釈した免疫精製アカゲザル Ig (A B 3) または B R 5 5 - 2 / マウス Ig G 3 と共に 1 時間、37 でインキュベーションする。H I V 陽性人血清 (試験キットの一部由来) を陽性対照として、正常人血清を陰性対照として使用する。試験サンプルの非結合決定基を 3 回 P B S 欠乏で洗い出し、2% F C S 含有 P B S 欠乏中の抗 - 人 - I g G - F I T C 試薬 (試験キットの一部) または抗 - マウス - I g G - F I T C (マウス M a b の検出のため) の 1 : 20 希釈を加える。37 で 30 分インキュベーション、3 回 P B S 欠乏で洗浄およびスライドのはめ込みの後、免疫蛍光が蛍光マイクロスコープ内で観察され、得点する (0 = 蛍光なし、5 = 最大蛍光)。

40

【0094】

実施例 16 : 人血清中の免疫活性 B R 5 5 - 2 / マウス Ig G 3 または B R 5 5 - 2 / マウス Ig G 2 a を測定するための抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 を使用した E L I S A

抗 - i d - B R 5 5 - 2 # E 4 (10 μ g / ml ; コーティング緩衝液中希釈) の 100 μ l のアリコートをマイクロタイタープレートのウェルに加え、37 で 60 分インキュベーションする。

【0095】

50

プレートに6回洗浄用緩衝液で洗浄し、PBS欠乏/5% FCS 200 μ lを加え、30分、37℃でインキュベーションする。プレートを上記のように洗浄する。BR55-2/マウスIgG3またはBR55-2/マウスIgG2a含有人血清をPBS欠乏/2% FCS中好適な希釈で試験する。これらのサンプルの100 μ lのアリコートマイクロタイタープレートのウェルに加え、60分、37℃でインキュベーションする。標準として、BR55-2/マウスIgG3またはBR55-2/マウスIgG2を正常人血清で10 μ g/mlに予備希釈する。PBS欠乏/2% FCS中の好適な希釈を上記のように処理する。非結合抗体を上記のように洗い出し、ペルオキシダーゼ-結合抗体(ツィメット試薬のようなウサギ-抗-マウスIgG3/ペルオキシダーゼまたはウサギ-抗-マウスIgG2a/ペルオキシダーゼ; PBS/2% FCS中1:1000)の100 μ lのアリコートを加える。30分、37℃でインキュベーションした後、ウェルを4回洗浄用緩衝液、2回染色液で洗浄する。

10

【0096】

基質溶液100 μ lのアリコートを加え、5分後、色の濃くなるのを4N H_2SO_4 の50 μ lのアリコートを加えることにより停止させる。光学的励起を492 nmで測定する(参考測定620 nm)。

血清サンプルのOD値は、標準曲線から読み取り、 μ g/mlで表す。

【0097】

実施例17: 抗-idBR55-2#E4を使用した人血清中の免疫反応性BR55-2/キメラ人IgG1を測定するためのELISA

20

BR55-2/キメラ人IgG1含有人血清を上記実施例16に記載のように、ペルオキシダーゼ結合抗体(ケミコン&カンパニーの試薬のようなヤギ-抗-人IgG/ペルオキシダーゼ; PBS/2% FCS中1:1000)を使用して試験する。

【0098】

実施例18: 抗-idBR55-2#E4を使用した人血清中の免疫反応性BR55-2/キメラ人IgG3を測定するためのELISA

BR55-2/キメラ人IgG3含有人血清を上記実施例17に記載のように試験する。

【0099】

実施例19: BR55-2/キメラ人IgG1およびBR55-2/人化IgG1と抗-idBR55-2 Mabの間の実時間生特異的相互作用測定

30

実験はファルマシア・バイオセンサー・アクチエポラーク、ウプサラ、スウェーデンのBIAcore(商標)系で行った。BR55-2/キメラ人IgG1またはBR55-2/人化IgG1の非動化RAM-IgG1(ファルマシア・バイオセンサー・アクチエポラーク、ウプサラ、スウェーデンの試薬のような)に捕獲された種々のマウスIgG1抗-idBR55-2 Mabへの結合を実時間生特異的相互作用測定で測定した。

【0100】

系の流速を5 μ l/分に調製した。センサーチップを蒸留水35 μ l中のNHS 0.201 mgおよびEDC 1.313 mgで活性化した。10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 5.0 35 μ lに30 μ g/mlの濃度で溶解されたRAM-IgG1を、次いで活性化センサー表面と反応させた。残存遊離活性化部位を1M エタノールアミンヒドロクロリド/NaOH、pH 8.5 35 μ lで遮断した。

40

【0101】

測定は3段階で行った:

1) 各々の抗-idBR55-2 Mab(E4、C11、B3、B9、G6、G9)を培地Hで希釈し、最終濃度10から17 μ g/mlにした。各々の測定において、抗-イディオタイプ抗体をRAM-IgG1に本溶液35 μ lをセンサー表面を通すことにより結合させた。結合抗-idBR55-2 Mabの質量の比である“反応単位”を記録し蓄積した。

2) マウス/人キメラIgG1の希釈20 μ lおよび培地H中の1-100 μ g/mlの濃度

50

の人化 I g G 1 を次いで注入し、捕獲抗 - i d に結合させる。結合 M a b の質量の比である“反応単位”を記録し蓄積した。

3) 次いで、センサー表面を 1 M ギ酸 5 μ l および 8 M 尿素 5 μ l の連続注入による次の分析のために再生した。

【0102】

結合率を第 2 抗体 (B R 5 5 - 2 / キメラ人 I g G 1 または B R 5 5 - 2 / 人化 I g G 1) で得られた最大反応単位および最初の抗体 (各々の抗 - イディオタイプ M a b) で得られた最大反応単位で計算することにより決定した。

実施例 20 : 抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 を使用した人血清中の免疫反応性 B R 5 5 - 2 / 人化 I g G 1 の測定のための E L I S A

10

B R 5 5 - 2 / 人化 I g G 1 含有人血清を、実施例 17 に記載のように試験する。

【0103】

実施例 21 : B R 5 5 - 2 / マウス I g G 3 の抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 への結合の B R 5 5 - 2 / キメラ人 I g G 1 または B R 5 5 - 2 / キメラ人 I g G 3 による競合

抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 (10 μ g/ml ; コーティング緩衝液中の希釈) の 100 μ l のアリコートマイクロタイタープレートのウェルに加え、37 で 60 分インキュベーションする。

プレートを 6 回洗浄用緩衝液で洗浄し、P B S 欠乏 / 5 % F C S 200 μ l を加え、30 分、37 でインキュベーションする。プレートを上記のように洗浄する。キメラ人 I g G 1 またはキメラ人 I g G 3 を P B S 欠乏 / 2 % F C S で希釈する (0.5 μ g/ml から 3 ng/ml)。これらの各々の希釈に、0.05 μ g/ml B R 5 5 - 2 / マウス I g G 3 を加える。これらのサンプルの 100 μ l のアリコートマイクロタイタープレートのウェルに加え、60 分、37 でインキュベーションする。非結合抗体を上記のように洗い出し、ペルオキシダーゼ - 結合抗体 (ケミコン・コーポレイテッド試薬のようなヤギ - 抗 - ヒト I g G / ペルオキシダーゼ ; P B S / 2 % F C S 中 1 : 1000) の 100 μ l のアリコートを加える。

20

【0104】

30 分、37 でインキュベーションした後、ウェルを 4 回洗浄用緩衝液、2 回染色液で洗浄する。

基質溶液 100 μ l のアリコートを加え、5 分後、色の濃くなるのを 4 N H₂SO₄ の 50 μ l のアリコートを加えることにより停止させる。光学密度 (O D) を 492 nm で測定する (参考測定 620 nm)。

30

【0105】

実施例 22 : B R 5 5 - 2 / マウス I g G 3 により媒介される S K B R 5 細胞系への補体依存細胞毒性 (C D C) - 抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 による阻害

測定の前日、S K B R 5 細胞を新鮮培地 A に移し、細胞培養フラスコ中で 37 / 5 % CO₂ に保つ。

【0106】

標的細胞の ⁵¹Cr 標識 :

細胞を培養フラスコから回収し、培地 A 800 μ l 中 5 × 10⁶ 細胞の濃度で 37 / 5 % CO₂ で 1 時間、100 μ Ci Na₂⁵¹CrO₄ とインキュベーションする。細胞を、次いで培地 A で洗浄し、過剰の ⁵¹Cr を除去し、新鮮培地 A に再懸濁し、その濃度を 2.5 × 10⁵ 細胞 / ml に調製する。

40

【0107】

C D C :

本標的細胞の懸濁液の 100 μ l のアリコートマイクロタイタープレートのウェルにピペットで移す。P B S 欠乏中所望の濃度に希釈した抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 の 50 μ l のアリコートを加える。次いで 2 μ g/ml B R 5 5 - 2 / I g G 3 含有人血清の 100 μ l のアリコートウェル毎に加え、細胞を一晩、37 / 5 % CO₂ でインキュベーションする。上清をスカトロン - ハーベスティング・プレスで回収し、 γ - カウンターで計

50

数する。これは実験的遊離の値を産生する。

【0108】

全⁵¹Cr遊離は、人血清を2% SDS、50mM Na₂CO₃ および10mM EDTAと置き換え、抗-idBR55-2#E4溶液をPBS欠乏50μlと置き換えることにより上記のように決定する。自然⁵¹Cr遊離は人血清を培地Aと置き換え、抗-idBR55-2#E4溶液をPBS欠乏50μlと置き換えて得る。

【0109】

計数後、結果を以下のように計算する：

実験的遊離 - 自然遊離

溶解% = $\frac{\text{全遊離} - \text{自然遊離}}{\text{全遊離} - \text{自然遊離}} \times 100$ 10

【0110】

実施例23：抗-idBR55-2#E4セファロースを使用したBR55-2/キメラ人IgG1の免疫親和精製

23.1：抗-idBR55-2#E4-セファロースの調製

凍結乾燥活性化CH-セファロース4B9gを1mM HClに懸濁し、焼結ガラスフィルターに移し、1mM HCl2lで15分洗浄する。配位子(抗-idBR55-2#E4 95mg)を連結緩衝液50mlに溶解し、栓をした容器内で洗浄したゲルと混合し、1時間室温でくるくる回転させる。ゲルを連結緩衝液で洗浄し、1時間1Mエタノールアミン50mlとインキュベーションし、残存活性基を遮断する。次いで、親和性収着媒を交互のpHで3サイクル洗浄する。各々のサイクルは、pH4(0.1M酢酸、0.5M NaCl)での洗浄、続くpH8(0.1M トリス、0.5M NaCl)での洗浄から成る。 20

【0111】

23.2：BR55-2/キメラ人IgG1の単離

クロマトグラフィーを4で行う。カラム(BIO REX MPカラム直径1.5cm)を抗-idBR55-2#E4-セファロース(容量35ml)で満たす。ゲルを結合緩衝液および溶出緩衝液で洗浄する。出発物質はBR55-2/キメラ人IgG1条件培地100lである。中空ファイバーカートリッジP10を装着したアミコンDC2濃縮系を使用した5：1濃縮後、濃縮物をカラムにかける。エスケーパーフラクションの溶出の後、結合BR55-2/キメラ人IgG1が溶出緩衝液と共に脱着し、脱着後すぐに1M トリス/HCl緩衝液、pH7.5で中和する。 30

【0112】

23.3：BR55-2/キメラ人IgG1の濃縮

溶出抗体溶液の濃縮を、PM10ジアフロ膜を使用した攪拌アミコン超濾過セル中で行う。IgGに対する溶質拒否は98%以上であり、IgGの最終濃縮は3.36mg/mlである。

【0113】

23.4：精製BR55-2/キメラ人IgG1の特徴付け

23.4.1：Mono-Qイオン交換クロマトグラフィー

カラム： Mono-QHR5/5(ファルマシア) 40
 緩衝液A： 20mM TEA、pH7.7
 緩衝液B： 20mM TEA、1M NaCl、pH7.7
 流速： 1ml/分
 検出： UV280nm
 勾配： 直線2%/分
 結果： >95%純度

【0114】

23.4.2：高速サイズ排除クロマトグラフィー

カラム： ゾルボックスGF250、9.4×250mm
 緩衝液： 0.1Mリン酸ナトリウム、0.2M NaCl、pH7.0 50

流速： 1 ml / 分
 検出： UV 280 nm
 結果： > 95 % 純度

【0115】

23.4.3 : SDS - PAGE

実験は、10%アクリルアミドゲルを使用して、還元条件下レミリーの方法に従って行う(結果は図10に示す)。

出発物質

マウスモノクローナル抗体BR55-2は、例えばそれぞれハイブリドーマBR55.2(BR55-2/IgG3)およびBR55.2s2a(BR-55-2/IgG2a)から入手可能である。 10

【0116】

これらのハイブリドーマは、本来それぞれ1987年2月17日および1987年3月10日に、アメリカ合衆国20852マサチューセッツ州、ロックビル、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに、ブタベスト条約の規則の下、受託番号それぞれATCC HB9324およびATCC HB9347で寄託された。

【図面の簡単な説明】

【0117】

【図1】単離された抗-idBR55-2MabのSDS-PAGEを示す。

【図2】単離された抗-idBR55-2Mabの等電点電気泳動を示す。 20

【図3】抗-idMabがAb1のその抗原への結合を阻害することを示すグラフである。

【図4】ウサギにおける細胞-ELISA(SKRB5細胞)で得られた代表的なIg-結合曲線を示す。

【図5】サルにおける細胞-ELISA(SKRB5細胞)で得られた代表的なIg-結合曲線を示す。

【図6】抗-idBR55-2#E4でワクチン処理したアカゲザルの全液性免疫反応を、マイクロタイタープレートを覆った抗-idBR55-2#E4を基にしたELISAを使用して測定した結果を示すグラフである。

【図7】抗-idBR55-2#E4でワクチン処理したアカゲザルの全液性免疫反応を、マイクロタイタープレートを覆った抗-idBR55-2#E4を基にしたELISAを使用して測定した結果を示すグラフである。 30

【図8】抗-idBR55-2#E4でワクチン処理したアカゲザルの全液性免疫反応を、マイクロタイタープレートを覆った抗-idBR55-2#E4を基にしたELISAを使用して測定した結果を示すグラフである。

【図9】非特異的マウス-IgG1でワクチン処理したアカゲザルの液性免疫反応をELISAを使用して検出した結果を示すグラフである。

【図10】非特異的マウス-IgG1でワクチン処理したアカゲザルの液性免疫反応をELISAを使用して検出した結果を示すグラフである。

【図11】種々の時点での、乳癌細胞系を使用した細胞-ELISAにおけるこれらの結果を示すグラフである。 40

【図12】種々の時点での、乳癌細胞系を使用した細胞-ELISAにおけるこれらの結果を示すグラフである。

【図13】種々の時点での、乳癌細胞系を使用した細胞-ELISAにおけるこれらの結果を示すグラフである。

【図14】種々の時点での、乳癌細胞系を使用した細胞-ELISAにおけるこれらの結果を示すグラフである。

【図15】種々の時点での、胃癌細胞系を使用した細胞-ELISAにおけるこれらの結果を示すグラフである。

【図16】種々の時点での、胃癌細胞系を使用した細胞-ELISAにおけるこれらの結 50

果を示すグラフである。

【図17】種々の時点での、小細胞肺癌細胞系を使用した細胞 - E L I S Aにおけるこれらの結果を示すグラフである。

【図18】種々の時点での、小細胞肺癌細胞系を使用した細胞 - E L I S Aにおけるこれらの結果を示すグラフである。

【図19】種々の時点での、大腸癌細胞系を使用した細胞 - E L I S Aにおけるこれらの結果を示すグラフである。

【図20】種々の時点での、メラノーマ細胞系を使用した細胞 - E L I S Aにおけるこれらの結果を示すグラフである。

【図21】2回目の免疫追加4および9週間後に得た溜た血清の免疫精製 I g - フラクシオンおよび抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 のエスケーパーフラクシオンの結合を測定した結果を示すグラフである。 10

【図22】2回目の免疫追加4および9週間後に得た溜た血清の免疫精製 I g - フラクシオンおよびエスケーパーフラクシオンおよび親マウス M a b (A B 1) の人化変形の結合特性を、S K B R 5 乳癌細胞で比較した結果を示すグラフである。

【図23】免疫精製サル I g (A B 3) と B R 5 5 - 2 / 人化 I g G 1 のルイス Y 陽性乳癌細胞系 S K B R 5 およびルイス Y 陰性メラノーマ細胞系 W M 9 に対する結合特性の比較を示すグラフである。

【図24】ルイス Y 陽性 S K B R 5 細胞系およびルイス Y 陰性細胞系 W M 9 の膜フラクシオンを使用した E L I S A により観察される、A B 3 - フラクシオンの同様な免疫反応性のパターンを示すグラフである。 20

【図25】免疫精製サル I g (A B 3) の結合特性を示すグラフである。

【図26】A B 3 - フラクシオンを、人 P B M C をエフェクター細胞として使用した A D C C 実験において、B R 5 5 - 2 / マウス I g G 3 (A B 1) と比較した結果を示すグラフである。

【図27】人血清中の B R 5 5 - 2 / マウス I g G 3 を測定するための E L I S A 標準曲線を示すグラフである。

【図28】人血清中の B R 5 5 - 2 / キメラ人 I g G 1 を測定するための E L I S A 標準曲線を示すグラフである。

【図29】人血清中の B R 5 5 - 2 / キメラ人 I g G 3 を測定するための E L I S A 標準曲線を示すグラフである。 30

【図30】抗 - i d B R 5 5 - 2 と B R 5 5 - 2 / キメラ人 I g G または B R 5 5 - 2 / 人化 I g G 1 の間の結合を示すグラフである。

【図31】抗 - i d B R 5 5 - 2 と B R 5 5 - 2 / キメラ人 I g G または B R 5 5 - 2 / 人化 I g G 1 の間の結合を示すグラフである。

【図32】抗 - i d B R 5 5 - 2 と B R 5 5 - 2 / キメラ人 I g G または B R 5 5 - 2 / 人化 I g G 1 の間の結合を示すグラフである。

【図33】抗 - i d B R 5 5 - 2 と B R 5 5 - 2 / キメラ人 I g G または B R 5 5 - 2 / 人化 I g G 1 の間の結合を示すグラフである。

【図34】抗 - i d B R 5 5 - 2 と B R 5 5 - 2 / キメラ人 I g G または B R 5 5 - 2 / 人化 I g G 1 の間の結合を示すグラフである。 40

【図35】抗 - i d B R 5 5 - 2 と B R 5 5 - 2 / キメラ人 I g G または B R 5 5 - 2 / 人化 I g G 1 の間の結合を示すグラフである。

【図36】人血清の B R 5 5 - 2 / 人化 I g G 1 を測定するための E L I S A 標準曲線を示すグラフである。

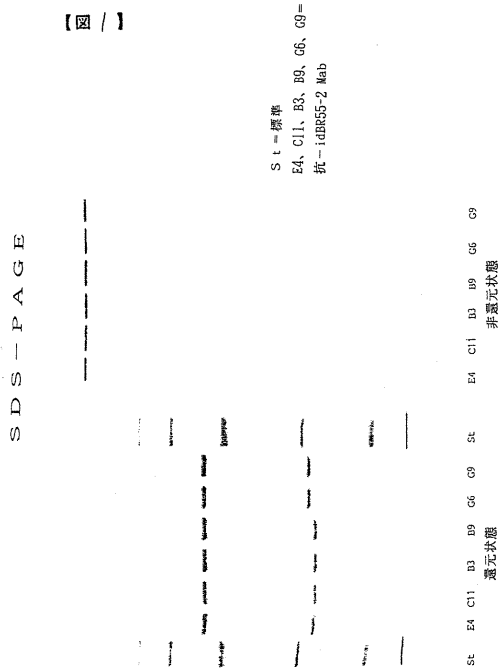
【図37】B R 5 5 - 2 / マウス I g G 3 の抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 への結合を B R 5 5 - 2 / キメラ人 I g G 1 および B R 5 5 - 2 / キメラ人 I g G 3 との比較により B R 5 5 - 2 全ての変異体の抗 - i d B R 5 5 - 2 M a b による結合領域の認識を示すグラフである。

【図38】S K B R 5 人乳癌細胞系に対する B R 5 5 - 2 / マウス I g G 3 により媒介さ 50

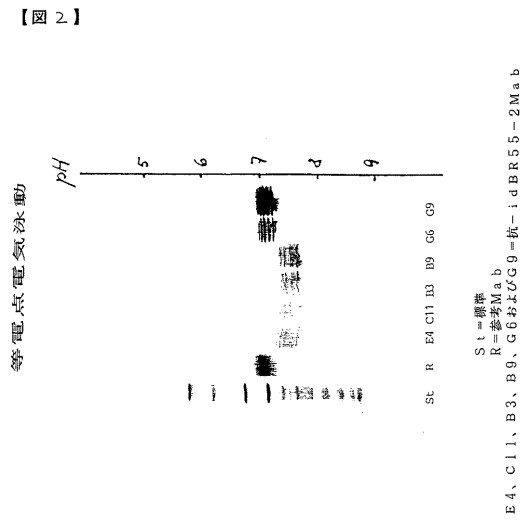
れた補体依存細胞毒性の抗 - i d B R 5 5 - 2 # E 4 による有効な中和を示すグラフである。

【 図 3 9 】 本発明を免疫精製法に使用した結果を示す S D S - P A G E である。

【 図 1 】

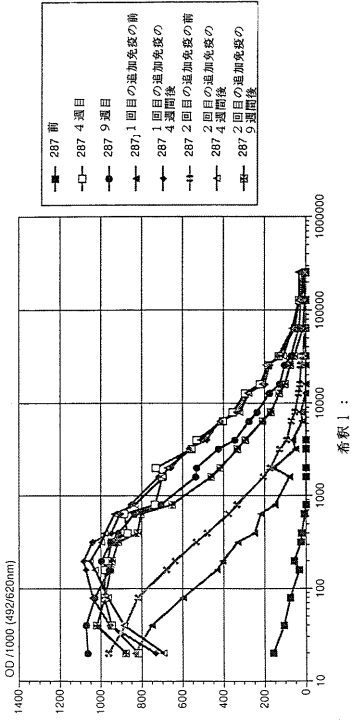


【 図 2 】



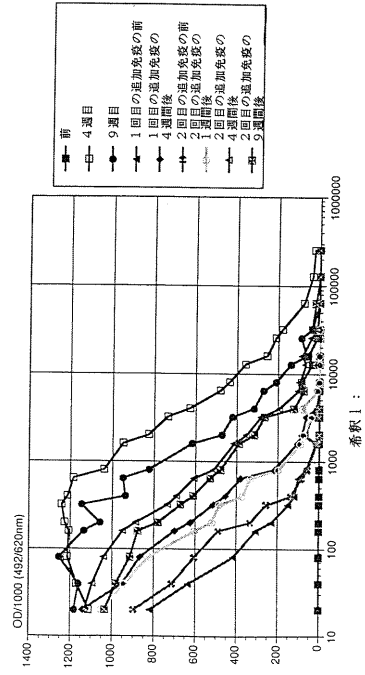
【 図 7 】

サル 287 の抗 - i d B R 55 - 2 # E 4 による免疫化
血清 I g の抗 - i d B R 55 - 2 # E 4 への結合
(E L I S A)



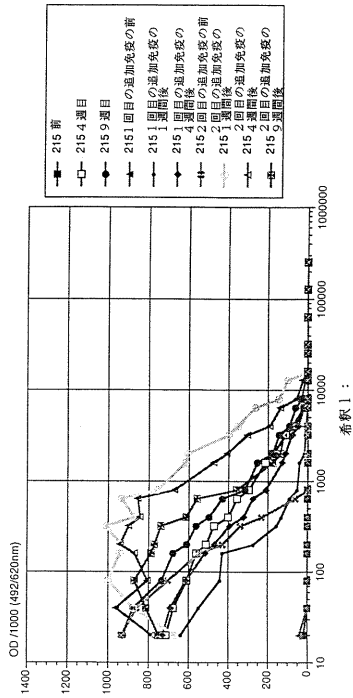
【 図 8 】

サル E 23 の抗 - i d B R 55 - 2 # E 4 による免疫化
血清 I g の抗 - i d B R 55 - 2 # E 4 への結合
(E L I S A)



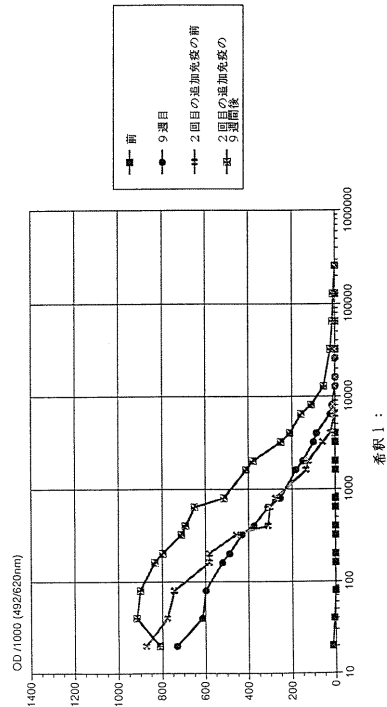
【 図 9 】

サル 215 の非関連マウス I g G 1 による免疫化
血清 I g の抗 - i d B R 55 - 2 # E 4 への結合
(E L I S A)



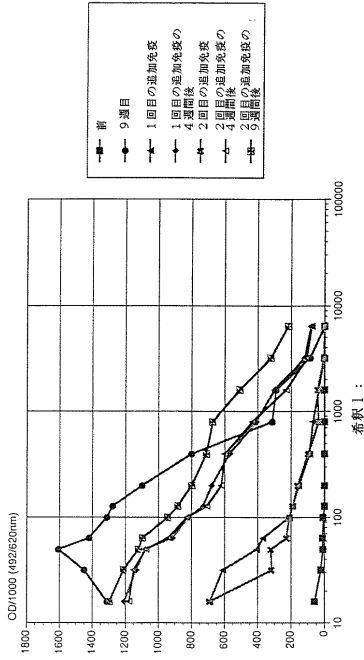
【 図 10 】

サル 252 の非関連マウス I g G 1 による免疫化
血清 I g の抗 - i d B R 55 - 2 # E 4 への結合
(E L I S A)



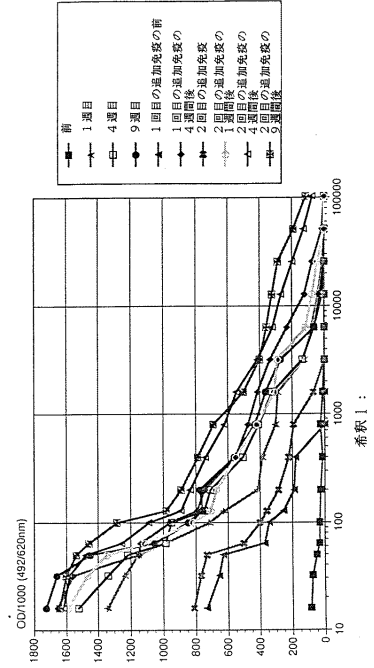
【図11】

サル2446の抗-idBR55-2#E4による免疫化
血清I γ のSKBR5乳癌細胞への結合
(細胞-ELISA)



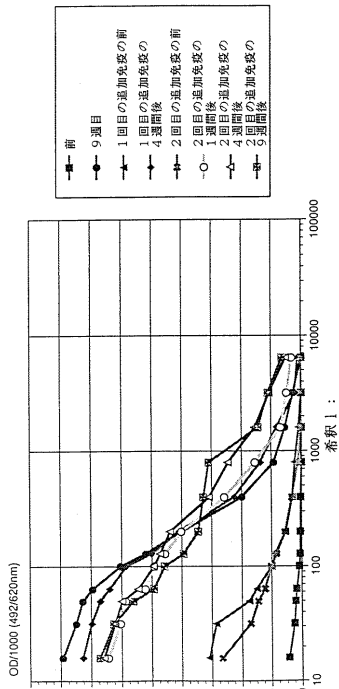
【図12】

サル287の抗-idBR55-2#E4による免疫化
血清I γ のSKBR5乳癌細胞への結合
(細胞-ELISA)



【図13】

サルE23の抗-idBR55-2#E4による免疫化
血清I γ のSKBR5乳癌細胞への結合
(細胞-ELISA)



【図14】

サル215の非関連マウスI γ G1による免疫化
血清I γ のSKBR5乳癌細胞への結合
(細胞-ELISA)

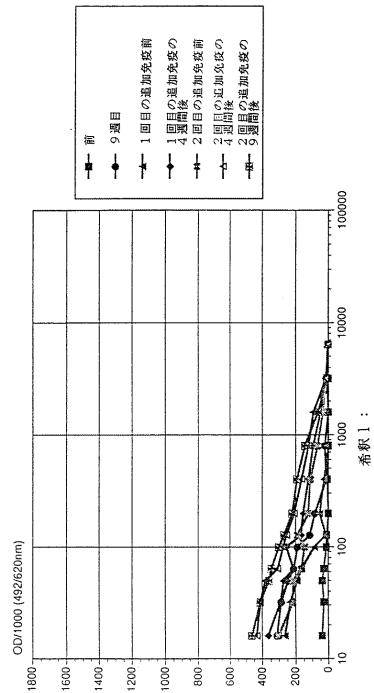
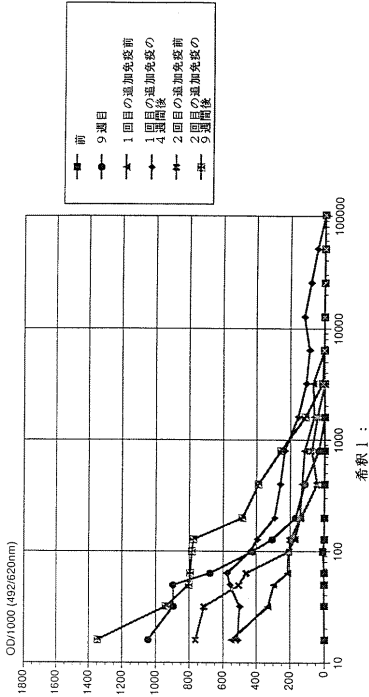


図14

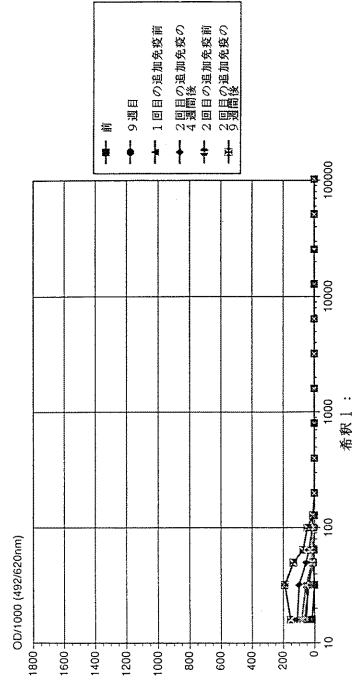
【図15】

サル246の抗-idBR55-2#E4による免疫化
血清I₅のCATO胃癌細胞への結合
(細胞-ELISA)



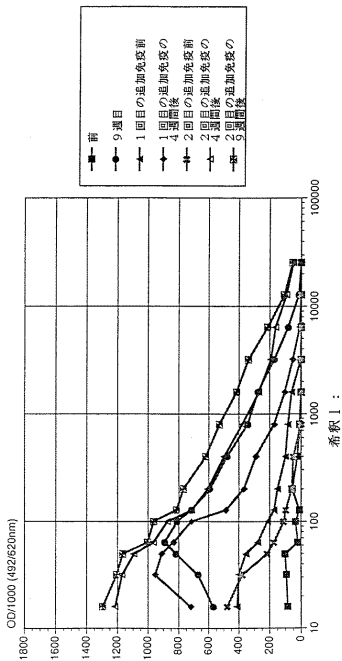
【図16】

サル215の非関連マウスI₅による免疫化
血清I₅のCATO胃癌細胞への結合
(細胞-ELISA)



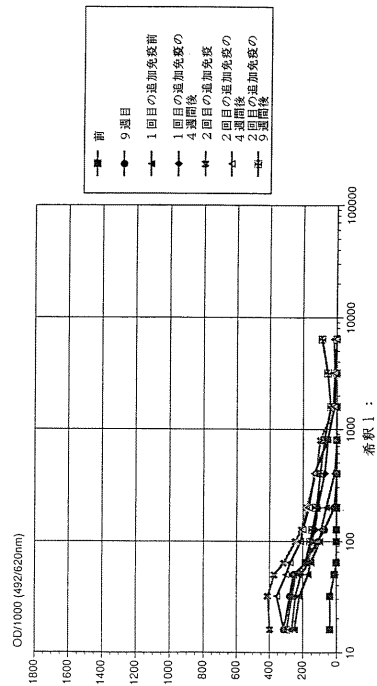
【図17】

サルE23の抗-idBR55-2#E4による免疫化
血清I₅のSW2小細胞肺癌細胞への結合
(細胞-ELISA)



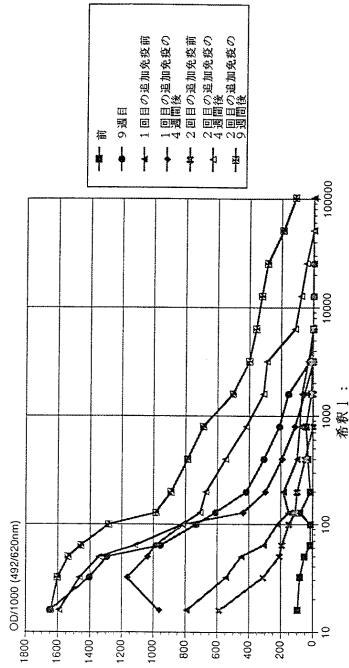
【図18】

サル215の非関連マウスI₅による免疫化
血清I₅のSW2小細胞肺癌細胞への結合
(細胞-ELISA)



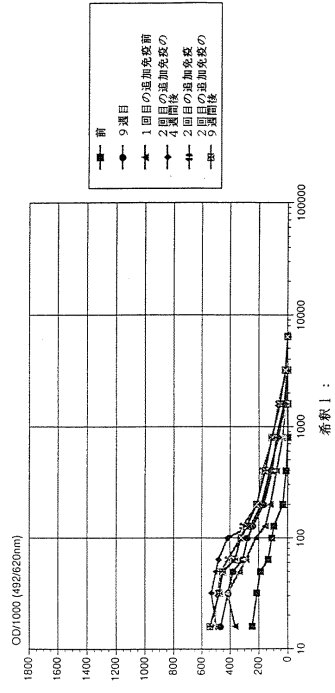
【図19】

サルE23の抗-idBR55-2#E4による免疫化
血清IεのSSW948大腸癌細胞への結合
(細胞-ELISA)



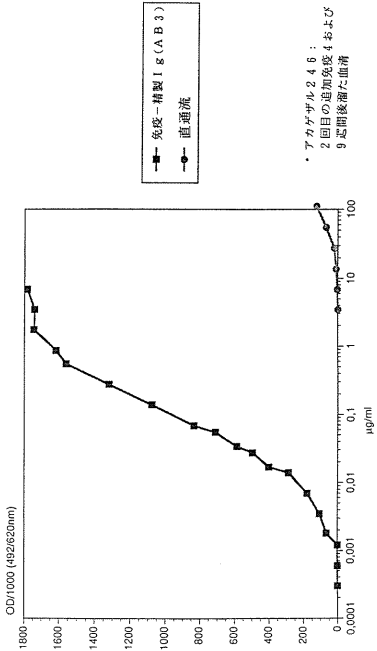
【図20】

サルE23の抗-idBR55-2#E4による免疫化
血清IεのWIM9メラノーマ細胞への結合
(細胞-ELISA)



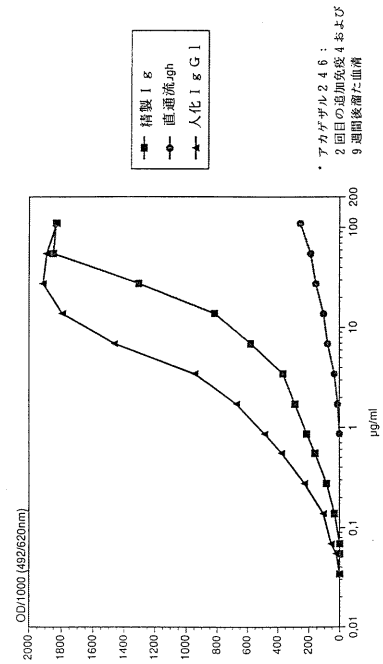
【図21】

抗-idBR55-2#E4免疫精製アカゲザルIε*
抗-idBR55-2#E4への結合
(ELISA)



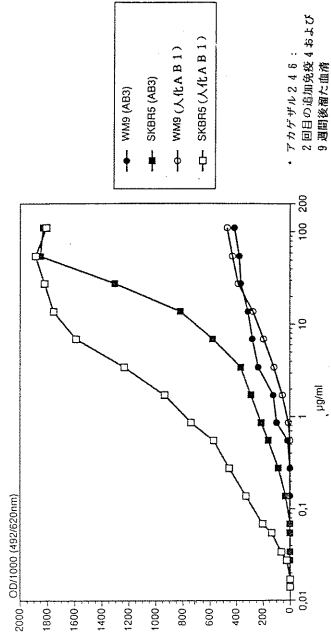
【図22】

抗-idBR55-2#E4免疫精製アカゲザルIε*
SKBR5乳癌細胞への結合(細胞-ELISA)



【図23】

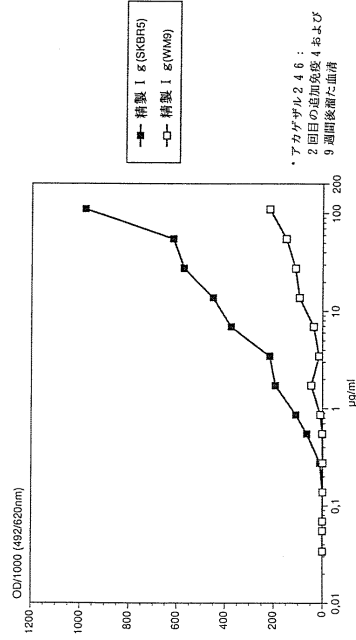
抗-idBR55-2#E4免疫精製アカゲザルIg* : WM9(メラノーマ)およびSKBR5(乳癌)細胞への結合(細胞-ELISA)



*アカゲサル246 : 2回目の追加免疫4および9週間後測定の血清

【図24】

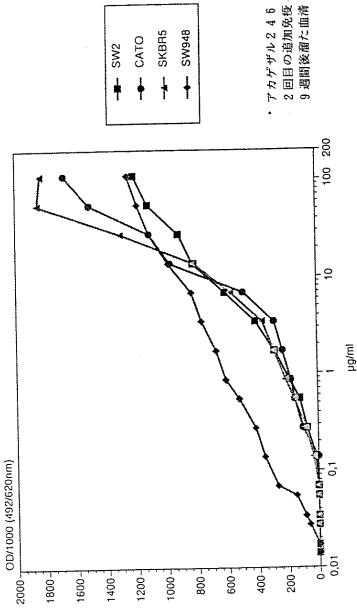
抗-idBR55-2#E4免疫精製アカゲザルIg* : SKBR5-およびWM9-膜調製物への結合(CELLISA)



*アカゲサル246 : 2回目の追加免疫4および9週間後測定の血清

【図25】

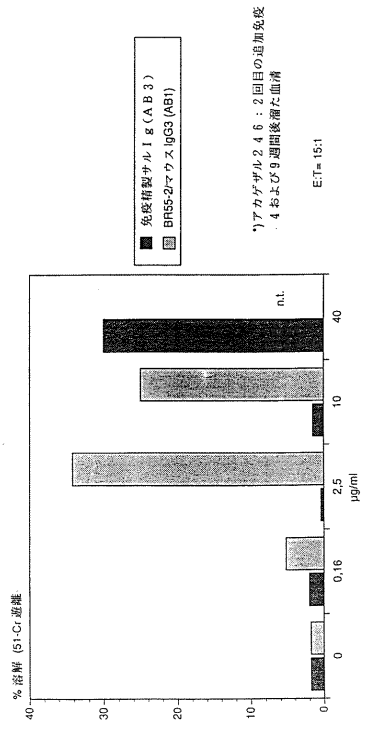
抗-idBR55-2#E4免疫精製アカゲザルIg* : 異なる細胞系への結合(細胞-ELISA)



*アカゲサル246 : 2回目の追加免疫4および9週間後測定の血清

【図26】

人PBMCおよびBR55-2/マウスIG3または抗-idBR55-2#E4で免疫精製アカゲザルIg*により媒介されるSKBR5細胞に対するADCC

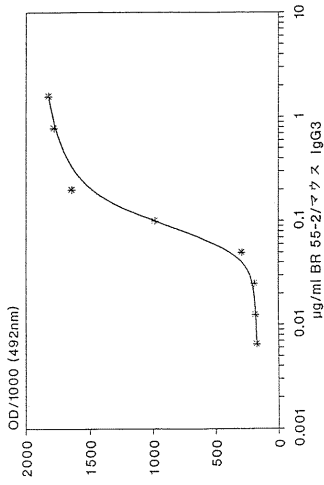


*アカゲサル246 : 2回目の追加免疫4および9週間後測定の血清

ET=15:1

【図27】

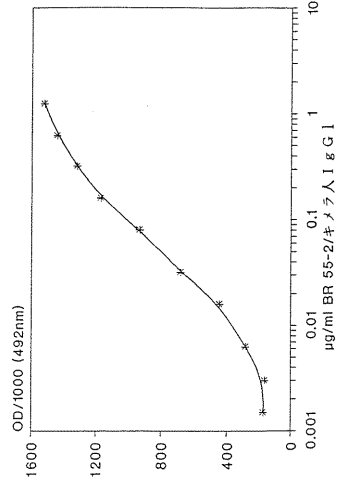
人血清中のBR55-2/マウスIgG3を測定するためのELISA標準曲線



【図28】

【図28】

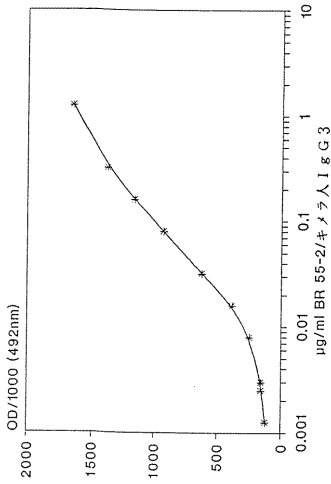
人血清中のBR55-2/キメラ人IgG1を測定するためのELISA標準曲線



【図29】

【図29】

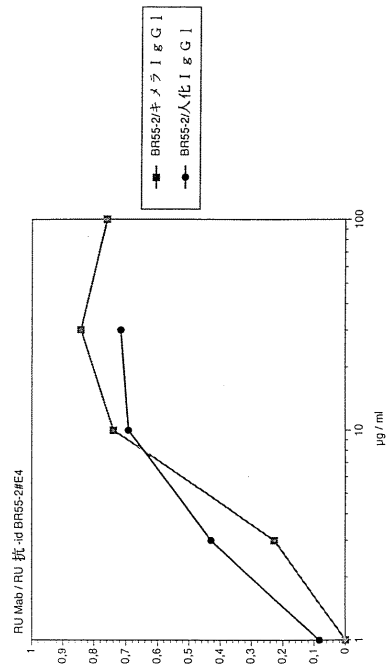
人血清中のBR55-2/キメラ人IgG3を測定するためのELISA標準曲線



【図30】

【図30】

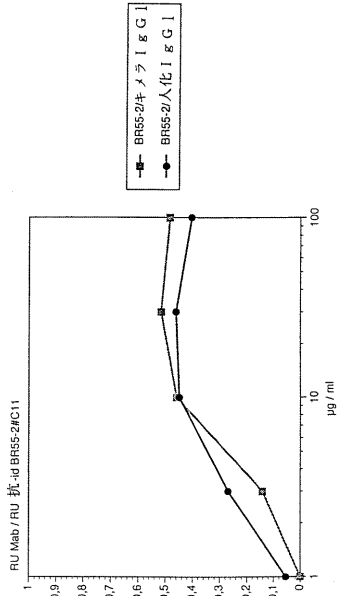
BR55-2/キメラIgG1およびBR55-2/人化IgG1の抗-idBR55-2#E4への結合



【 図 3 1 】

【 図 3 】

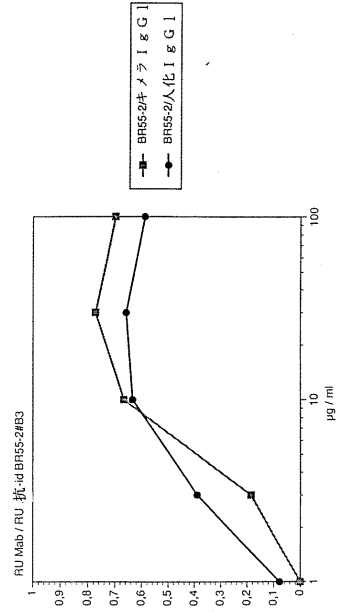
BR55-2 / キメラ I g G1 および BR55-2 / 人化 I g G1 の抗-idBR55-2 #C11 への結合



【 図 3 2 】

【 図 2 】

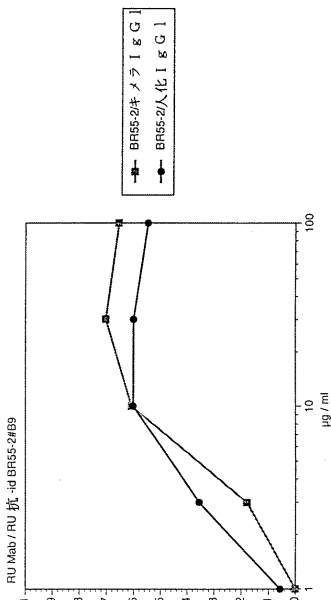
BR55-2 / キメラ I g G1 および BR55-2 / 人化 I g G1 の抗-idBR55-2 #B3 への結合



【 図 3 3 】

【 図 3 】

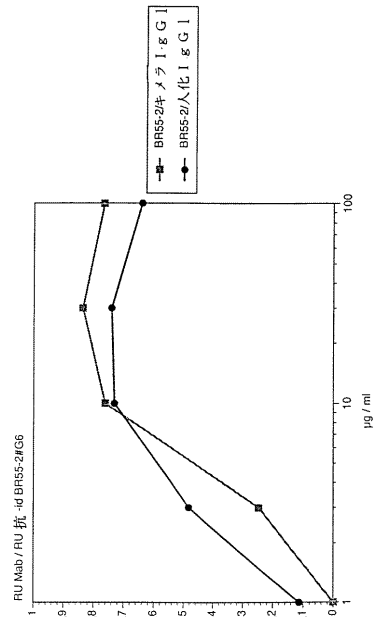
BR55-2 / キメラ I g G1 および BR55-2 / 人化 I g G1 の抗-idBR55-2 #B9 への結合



【 図 3 4 】

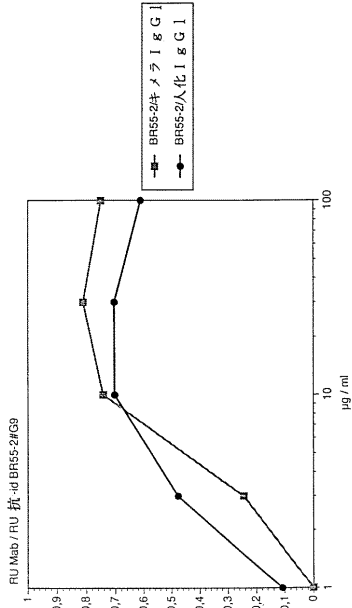
【 図 2 】

BR55-2 / キメラ I g G1 および BR55-2 / 人化 I g G1 の抗-idBR55-2 #G6 への結合



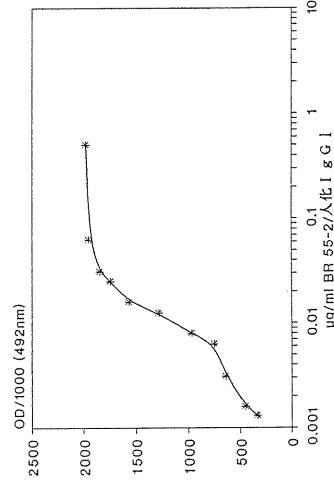
【 図 3 5 】

BR55-2/キメラIgG1およびBR55-2/人化IgG1の抗-idBR55-2#G9への結合



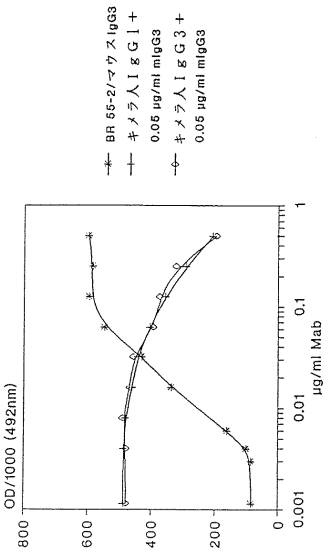
【 図 3 6 】

人血清中のBR55-2/人化IgG1を測定するためのELISA標準曲線



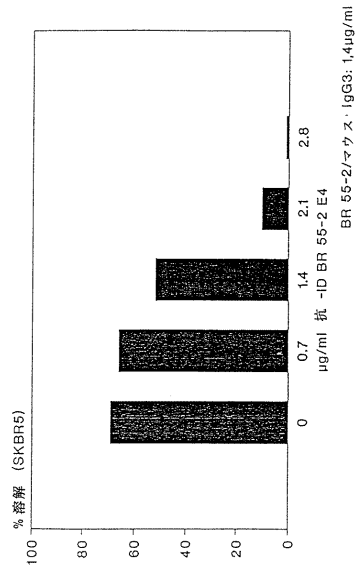
【 図 3 7 】

抗-idBR55-2へのBR55-2/マウスIgG3のBR55-2/キメラ人化IgG1およびBR55-2/人化IgG3との競合結合



【 図 3 8 】

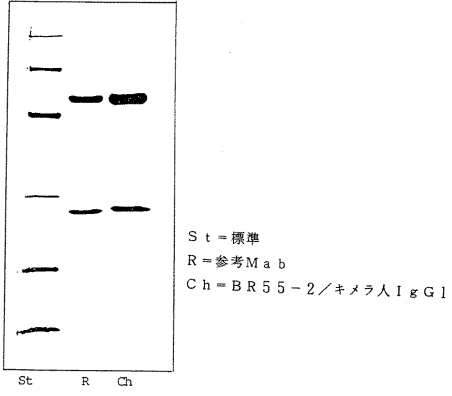
BR55-2/マウスIgG3により媒介される補体依存性細胞毒性 抗-idBR55-2#E4による阻害



【 図 3 9 】

【 図 3 9 】

S D S - P A G E
還元状態



フロントページの続き

| | | | |
|---------------------------------------|--|---------------|------------|
| (51) Int.Cl. | | F I | テーマコード(参考) |
| A 6 1 P 31/18 (2006.01) | | A 6 1 P 31/18 | |
| C 1 2 P 21/08 (2006.01) | | C 1 2 P 21/08 | |

(72)発明者 ヘルベルト・ヤクシェ

オーストリア国アー - 1 0 5 0 ウィーン、シュトラウセンガッセ 5 / 5 番

(72)発明者 エベリン・ヤンツェク

オーストリア国アー - 1 2 3 0 ウィーン、アウエル・ベルスバッハ - シュトラーセ 2 0 番

(72)発明者 ハンス・ロイブナー

オーストリア国アー - 1 2 3 8 ウィーン、ハイムガッセ 2 3 番

(72)発明者 ディーター・ショルツ

オーストリア国アー - 1 0 4 0 ウィーン、バイリンガーシュトラーセ 3 1 / 5 番

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CE10 DA05 DA13

4C085 AA03 AA14 BB31 CC22 EE01

4H045 AA11 AA30 CA42 DA76 EA28 EA50 FA72

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 针对Lewis Y特异性单克隆抗体BR 55-2的抗独特型单克隆抗体及其用途 | | |
| 公开(公告)号 | JP2006143738A | 公开(公告)日 | 2006-06-08 |
| 申请号 | JP2005346456 | 申请日 | 2005-11-30 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 瑞士商诺华公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 诺华股份公司 | | |
| [标]发明人 | ヘルムートエッケルト ヘルベルトヤクシエ エペリンヤンツェク ハンスロイブナー ディーターショルツ | | |
| 发明人 | ヘルムート・エッケルト ヘルベルト・ヤクシエ エペリン・ヤンツェク ハンス・ロイブナー ディーター・ショルツ | | |
| IPC分类号 | C07K16/42 G01N33/577 A61K39/395 A61K39/00 A61P35/00 A61P31/18 C12P21/08 C12N15/02 A61K31/00 A61P31/00 A61P31/12 C07K16/00 C07K16/10 C07K16/30 C12N5/18 C12R1/91 G01N33 /53 G01N33/569 G01N33/574 | | |
| CPC分类号 | A61K39/00 A61P31/00 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 C07K16/10 C07K16/3023 C07K16/3053 C07K16/42 C07K16/4266 C07K2317/732 C07K2317/734 G01N33/56972 G01N33/56988 G01N33 /57423 G01N33/57492 | | |
| FI分类号 | C07K16/42 G01N33/577.B A61K39/395.M A61K39/00.H A61P35/00 A61P31/18 C12P21/08 | | |
| F-TERM分类号 | 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE10 4B064/DA05 4B064/DA13 4C085 /AA03 4C085/AA14 4C085/BB31 4C085/CC22 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA42 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA72 | | |
| 优先权 | 1992010930 1992-05-22 GB 1992010929 1992-05-22 GB 1992010944 1992-05-22 GB | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

要解决的问题：为单克隆抗体BR55-2 (Ab1) 提供单克隆鼠内部图像抗独特型抗体 (Ab2) 的产生，生产和表征。ŽSOLUTION：单克隆抗体单克隆抗体BR55-2 (Ab1) 的单克隆鼠内部图像抗独特型抗体 (Ab2) 。

【图 2】

