

(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2007-530456

(P2007-530456A)

(43) 公表日 平成19年11月1日(2007.11.1)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	T 4 B O 6 3
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 5
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53	Y
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 73 頁)

(21) 出願番号	特願2007-504225 (P2007-504225)	(71) 出願人	504236592
(86) (22) 出願日	平成17年3月23日 (2005. 3. 23)		アリアス リサーチ、インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成18年11月13日 (2006. 11. 13)		カナダ国、エム5ジェイ 1アールワイ
(86) 国際出願番号	PCT/CA2005/000441		オンタリオ、トロント、シックスティーン
(87) 国際公開番号	W02005/092375		ス フロア、ヨーク ストリート 55
(87) 国際公開日	平成17年10月6日 (2005. 10. 6)	(74) 代理人	100086461
(31) 優先権主張番号	10/810, 165		弁理士 齋藤 和則
(32) 優先日	平成16年3月26日 (2004. 3. 26)	(74) 代理人	100086287
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 伊東 哲也
		(72) 発明者	ヤング、デイヴィッド、エス.、エフ. カナダ国、エム5ジェイ 2エス7 オン タリオ、トロント、ユニバーシティ アヴ ェニュー 33、スート 2407

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD44表面発現を示している細胞の細胞障害性調節

## (57) 【要約】

CD44抗原性部位を発現するヒト腫瘍の処置ならびに癌細胞の単離および同定方法のための抗体(CDMA B)H460-16-2の使用。CD44抗原性部位に結合するモノクローナル抗体H460-16-2(ATTC受託番号PTA-4621)は、癌細胞に対する細胞障害性を有する。ここで、細胞障害性は、抗体依存性細胞障害作用(ADCC)および補体依存性細胞障害作用(CDD)を介して調節される。モノクローナル抗体H460-16-2は、ヒト腫瘍の疾患進行遅延に有用である。

【選択図】 図1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

癌疾患を患っている患者を処置する方法であって、

前記患者に対して、癌疾患の処置に有用である抗癌抗体の生産方法に基づいて生産され、癌組織の細胞に対する細胞障害性を示し非癌細胞に対しては本来毒性を持たないという性質を持つ抗癌抗体またはそのフラグメントを投与することを含み、

前記抗体またはそのフラグメントを医薬的に許容されるアジュバントと混合し、前記癌疾患の処置を調節するのに有効な量で投与し、

前記抗体が、前記癌組織によって発現される抗原性部位に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントであり、前記抗原性部位が、PTA-4621としてATCCに寄託されたクローンによってコードされるモノクローナル抗体の同定された特徴を持つ抗体によって結合しているという性質を持つ、癌疾患を患っている患者を処置する方法。

10

## 【請求項 2】

前記抗体またはそのフラグメントがヒト化またはキメラ化されている、請求項 1 にもとづく癌疾患を患っている患者を処置するための方法。

## 【請求項 3】

請求項 1 にもとづく癌疾患を患っている患者を処置する方法であって、前記抗体またはその抗原結合フラグメントを毒素、酵素、放射性化合物と血液原細胞からなる群から選択されるものと複合体化することで抗体複合体を形成すること、

20

前記患者に前記抗体複合体または結合フラグメントを投与すること、

前記抗体複合体または結合フラグメントを医薬的に許容されるアジュバントと混合し、前記癌疾患の処置を調節するために、効果的用量で投与することを含む、請求項 1 にもとづく癌疾患を患っている患者を処置する方法。

## 【請求項 4】

前記抗体またはそのフラグメントがヒト化またはキメラ化している、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記抗体またはそのフラグメントの細胞障害性が抗体依存型細胞障害性に依存している、請求項 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 6】

前記抗体またはフラグメントの細胞障害性は、補体従属する細胞障害性を通して調節される、請求項 1 にもとづく癌疾患を患っている患者を処置する方法。

## 【請求項 7】

前記抗体またはフラグメントの細胞障害性は、細胞化学結合の加水分解の触媒作用を及ぼすことを通して調節される、請求項 1 にもとづく癌疾患を患っている患者を処置する方法。

## 【請求項 8】

前記抗体またはフラグメントの細胞障害性は、腫瘍細胞にあって推定上癌抗原に対して免疫反応を生産することを通して調節される、請求項 1 にもとづく癌疾患を患っている患者を処置する方法。

40

## 【請求項 9】

前記抗体またはフラグメントの細胞障害性は、それらの機能に干渉するために、細胞膜蛋白のターゲティングを通して調節される、請求項 1 にもとづく癌疾患を患っている患者を処置する方法。

## 【請求項 10】

前記抗体またはフラグメントの細胞障害性は、細胞殺害をイニシエートするためにシグナルを生産するために、効果的細胞タンパク質で、構造変化の生産を通して調節される、請求項 1 にもとづく癌疾患を患っている患者を処置する方法。

## 【請求項 11】

50

生産の前記方法は、特定の個体から得られるガンで非ガン細胞を含んでいる組織標本を利用する組織標本を利用する、請求項 1 にもとづく癌疾患を患っている患者を処置する方法。

【請求項 1 2】

抗体または抗原結合フラグメントが癌疾患を処置する際に有用である抗癌抗体の生産のための方法に従って生産した前記患者に投与することは、ガン組織の細胞に対して細胞障害性で、非癌細胞に基本的に良性の抗体であり、前記抗体は P T A - 4 6 2 1 としての A T C C またはその抗原結合フラグメントで寄託されたクローンによってコードされる単離したモノクローナル抗体を投与すること、医薬的に許容可能なアジュバントで混合物に置かれて、前記癌疾患の処置を調節するために、効果的量で投与される、癌疾患を患っている患者を処置する方法。 10

【請求項 1 3】

前記抗体またはそのフラグメントは、ヒト化またはキメラ化した、請求項 1 2 にもとづく癌疾患を患っている患者を処置する方法。

【請求項 1 4】

抗体複合体が形成されるそれによって毒素、酵素、放射性化合物と血液原細胞からなる群から選択されるメンバーとその前記抗体またはフラグメントを抱合することを含み、前記患者にその投与している前記抗体複合体またはフラグメント；そこで前記結合抗体は医薬的に許容可能なアジュバントで混合物に置かれて、前記癌疾患の処置を調節するために、効果的量で投与される、請求項 1 2 にもとづく癌疾患を患っている患者を処置する方法。 20

【請求項 1 5】

前記抗体またはフラグメントが前記サブセットから選択されるその点では、ヒト化またはキメラ化した、請求項 1 4 にもとづく癌疾患を患っている患者を処置する方法。

【請求項 1 6】

癌疾患を患っている患者を処置する方法：その前記抗体またはフラグメントの細胞障害性は、抗体従属する細胞障害性を通して調節される、請求項 1 2 にもとづく癌疾患を患っている患者を処置する方法。

【請求項 1 7】

前記抗体またはフラグメントの細胞障害性は、抗体従属する細胞障害性を通して調節される、請求項 1 2 にもとづく癌疾患を患っている患者を処置する、請求項 1 2 にもとづく癌疾患を患っている患者を処置する方法。 30

【請求項 1 8】

前記抗体またはフラグメントの細胞障害性は、細胞化学結合の加水分解の触媒作用を及ぼすことを通して調節される、請求項 1 2 にもとづく癌疾患を患っている患者を処置する方法。

【請求項 1 9】

前記抗体またはフラグメントの細胞障害性は、腫瘍細胞にあって推定上癌抗原に対して免疫反応を生産することを通して調節される、請求項 1 2 にもとづく癌疾患を患っている患者を処置する方法。 40

【請求項 2 0】

前記抗体またはフラグメントの細胞障害性は、それらの機能に干渉するために、細胞膜蛋白のターゲティングを通して調節される、請求項 1 2 にもとづく癌疾患を患っている患者を処置する方法。

【請求項 2 1】

前記抗体またはフラグメントの細胞障害性は、細胞殺害をイニシエートするためにシグナルを生産するために、効果的細胞タンパク質で、構造変化の生産を通して調節される、請求項 1 2 にもとづく癌疾患を患っている患者を処置する方法。

【請求項 2 2】

生産の前記方法は、特定の個体から得られるガンで非ガン細胞を含んでいる組織標本を利用 50

用する、請求項 1 2 にもとづく癌疾患を患っている患者を処置する方法。

【請求項 2 3】

細胞表面の上で C D 4 4 抗原性部位を発現するヒト腫瘍細胞の細胞障害性を調節する方法であって、

単離したモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントによる前記腫瘍細胞を接触させ、前記抗体または抗原結合はそれについて単離したモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントであることを分解し、また、前記発現された C D 4 4 抗原性部位に対する結合は細胞傷害性が前記結合の結果として起こるそれによって P T A - 4 6 2 1 と同程度 A T C C で寄託されたクローンによってコードされるモノクローナル抗体の同定し、細胞障害性が前記結合の結果として生ずる、細胞表面上の C D 4 4 抗原性部位を発現するヒト腫瘍細胞の細胞障害性を調節するプロセス。

10

【請求項 2 4】

前記単離した抗体またはその抗原結合フラグメントは、ヒト化またはキメラ化した、請求項 2 3 のプロセス。

【請求項 2 5】

抗体複合体が形成されるそれによって細胞障害性の部分、酵素、放射性化合物と血液原細胞からなる群から選択されるメンバーと複合体形成させた、前記単離した抗体または抗原結合フラグメントがある請求項 2 3 のプロセス。

【請求項 2 6】

前記単離した抗体または抗原結合フラグメントがヒト化またはキメラ化した請求項 2 3 のプロセス。

20

【請求項 2 7】

前記単離した抗体または抗原結合フラグメントがマウスである請求項 2 3 のプロセス。

【請求項 2 8】

ヒト腫瘍組織試料が大腸、卵巣、肺、前立腺、および乳房組織からなる群から選択される組織から生じている腫瘍から得られる、請求項 2 8 のプロセス。

【請求項 2 9】

単離したモノクローナル抗体に対する特異的結合が P T A - 4 6 2 1 として A T C C で寄託されたクローンによってコードした C D 4 4 抗原性部位を発現する細胞の存在を決定する結合実験またはその抗原結合フラグメントを発現する細胞の存在を決定する結合アッセイであって、

30

単離したモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する、前記抗体または抗原結合は、それについて単離したモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントであることを分解する前記発現された C D 4 4 抗原性部位 ( P T A - 4 6 2 1 と同程度 A T C C で寄託されたクローンによってコードされるモノクローナル抗体の同定している特徴を有している抗体に結合していて特徴づけられる前記抗原性部位 ) にどの結合 ; 前記細胞試料で前記単離したモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを接触させること ; そして、前記細胞試料で前記単離したモノクローナル抗体の結合またはその抗原結合フラグメントを決定することを含み、前記単離したモノクローナル抗体に対する特異的結合またはその抗原結合フラグメントがそうである C D 4 4 抗原性部位を発現する細胞の存在を決定する、結合アッセイ。

40

【請求項 3 0】

前記細胞試料が大腸、肺、前立腺、および乳房組織からなる群から選択される組織から生じている腫瘍から得られてれる請求項 2 9 の結合アッセイ。

【請求項 3 1】

単離モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントに特異的に結合する C D 4 4 抗原性部位を発現する試料に含まれる細胞を単離またはスクリーニングするためのものであり、前記抗原性部位が、 P T A - 4 6 2 1 として A T C C で寄託されたクローンによってコードした抗体に結合することによって特徴づけられるプロセスであって、

細胞試料を提供すること、単離したモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメ

50

ントを提供し、前記抗体または抗原結合は、それについて単離したモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントであることを分解する前記発現されたCD44抗原性部位（PTA-4621と同程度ATCCで寄託されたクローンによってコードされるモノクローナル抗体の同定している特徴を有している抗体に結合して特徴づけられる前記抗原性部位）にどの結合；前記細胞試料で前記単離したモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを接触させること、ならびに前記細胞試料で前記単離したモノクローナル抗体の結合またはその抗原結合フラグメントを決定すること、特に単離したモノクローナル抗体に対する結合がPTA-4621としてのATCCまたはその抗原結合フラグメントで寄託されたクローンによってコードしたCD44抗原性部位を発現するそれによって前記細胞は前記結合によって単離することで、前記細胞試料のそれらの存在が確認される、プロセス。

10

【請求項32】

細胞試料が大腸、肺、前立腺、および乳房組織からなる群から選択される組織から生じている腫瘍から得られる請求項31のプロセス。

【請求項33】

ほ乳類のヒト腫瘍を処置することで、生存率を高め、および/または疾患進行を遅らせる方法であって、

前記腫瘍は、前記哺乳類に投与することを含んでいる受託番号PTA-4621が疾患進行が後発性であるおよび/または生存が広げられるそれによって前記哺乳類の全身腫瘍組織量を減らすために効果的量でモノクローナル抗体を言ったので、特にモノクローナル抗体に対する結合またはクローンでコードされるモノクローナル抗体の同定している特徴を有する抗原結合フラグメントがそれについてATCCで堆積させた抗原を発現する、方法。

20

【請求項34】

前記抗体が細胞障害性の部分に抱合した、請求項33の方法。

【請求項35】

前記細胞障害性の部分が放射性同位元素である、請求項33の方法。

【請求項36】

前記抗体が補体を活性化させる、請求項33の方法。

【請求項37】

前記抗体が抗体依存性細胞障害作用を調節する、請求項33の方法。

30

【請求項38】

前記抗体がマウスの抗体である請求項33の方法。

【請求項39】

前記抗体がヒト化抗体である請求項33の方法。

【請求項40】

前記抗体がキメラ化された抗体である請求項33の方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌疾患の診断および処置、詳しくは腫瘍細胞の細胞障害性の調節、および最も詳しくは細胞障害性反応をイニシエートするための手段としての癌疾患修飾抗体（CDMA B）の使用（一種類以上の化学療法剤と任意に併用させた状態で）に関する。本発明はさらに、本発明のCDMA Bを利用する結合アッセイに関する。

【背景技術】

【0002】

ヒト白血球に対するモノクローナル抗体の産生は、CD44抗原の発見をもたらした。このCD44抗原は、単鎖のヒアルロン酸（HA）結合糖タンパク質であり、広範囲に及

50

ぶ正常組織および全ての種類の造血細胞上で発現する。CD44抗原は、当初、リンパ球活性化およびリンパ球ホーミングに結びつけて考えられていた。現在、一般に考えられているその生理学的役割として、炎症性遺伝子の活性化、細胞周期の変調、細胞増殖の誘導、分化および発現の誘導、細胞骨格再構成および細胞移動の誘導、ならびにアポトーシスに対する細胞生存/耐性も挙げられる。

#### 【0003】

ヒトでは、CD44の単一遺伝子コピーが第11染色体の短腕(11p13)上に位置している。この遺伝子は、19個のエクソンを含み、最初の5個が定常、次の9個が可変、その後の3個が定常、さらに最後の2個が可変である。選択的スプライシングによって、1,000を上回る異なったアイソフォームを得ることができる。しかし、現在のところ、同定された天然の変異体は数十にすぎない。

10

#### 【0004】

CD44標準糖タンパク質は、N末端細胞外(20アミノ酸長のリーダー配列および膜近位領域(85アミノ酸長)を含む)領域(270アミノ酸長)、膜貫通領域(21アミノ酸長)、ならびに細胞質尾部(72アミノ酸長)からなる。細胞外領域は、N末端に連結モジュールも有する。この領域は、92アミノ酸長であり、多くのHA結合連結タンパク質に対して相同性を示す。ヒトCD44の形態とマウスCD44の形態とのあいだに高い相同性がある。そのタンパク質の可変型をエクソン5のカルボキシル基末端に挿入すると発現の際に細胞外に位置する。CD44の血清可溶型も天然に生じ、停止コドン(可変領域内)またはタンパク質分解活性に起因し得る。

20

#### 【0005】

CD44の血清可溶形も天然に生じ、終止コドン(可変領域内)またはタンパク質分解活性のいずれかに起因し得る。TNF- $\alpha$ を含む種々の刺激による細胞の活性化によって、腫瘍細胞によるCD44受容体の遊離放出が生ずる。この受容体の遊離放出は、腫瘍細胞によっても見られ、それによってCD44の血清濃度が最高10倍まで増加する。CD44の血清濃度が高いことは、悪性(例外として卵巣癌)であることを示唆している。

#### 【0006】

CD44の標準形態は、分子量約37kDを有するものとして存在する。翻訳後の修飾は、分子量を80~90kDに増加させる。このような修飾として、アスパラギン残基でのアミノ末端細胞外領域N結合グリコシル化、細胞外領域のカルボキシル末端でのセリン/スレオニン残基のO-結合グリコシル化、およびグリコサミノグリカン付加が挙げられる。スプライス変異体の大きさは、80~250kDの範囲内にある。ほ乳類動物の細胞外マトリックス(ECM)に位置する多糖類であるHAは、主要なCD44リガンドとして考えられる。しかし、コラーゲン、フィブロネクチン、およびラミニン等のタンパク質にCD44が結合するという知見も得られている。

30

#### 【0007】

不活性CD44(HAに結合せず)のグリコシル化の度合いは最も高く、活性CD44(HAに結合)の場合は最も低く、誘導性CD44(サイトカイン、モノクローナル抗体、増殖因子等によって活性化されない限り、HAに結合しないか、結合しても弱い)のグリコシル化の度合いは、活性型と不活性型とのおおよそ中間にある。

40

#### 【0008】

CD44は、細胞の相互作用、刺激、および環境に左右される複数のシグナル伝達経路を介して、その機能の一部を調節することができる。これらの伝達経路の一部として、NF $\kappa$ Bシグナル伝達カスケード(炎症反応に関連)、Ras-MARKシグナル伝達経路(細胞周期および増殖の活性化に関連)、タンパク質のRhoファミリー(細胞骨格再構築および細胞移動に関連)、ならびにPI3-K-関連シグナル伝達経路(細胞生存に関連)が挙げられる。上記機能の全てが主要疾患開始および進行と密接に関連している。CD44も種々の付加的な機構によって癌の原因に関係があるとされている。これらの機構として、悪性疾患に関係する受容体に対するCD44の細胞表面上に存在する細胞表面プロテオグリカンによる増殖因子、ケモカイン、およびサイトカインの提示が挙げられる。

50

また、CD44-HA複合体のインターナリゼーション後にリソソーム・ヒアウロニダーゼによるHAの細胞内分解によって、ECMを介した新脈管形成の誘導と腫瘍侵襲性の可能性とが潜在的に増加し得る。さらに、生存またはアポトーシスのシグナルの伝達は、標準的または可変的CD44受容体を介して生ずることが示されている。CD44は、細胞分化および移動に関係することが示唆された。全てではないにしても、これらの機構の多くが環境および細胞に依存しており、さらにいくつかは結果にばらつきが生じた。したがって、何らかの結論が出される前に、より多くの研究をおこなうことが求められている。

#### 【0009】

癌でのCD44の潜在的な機能的役割を確認するために、CD44の発現を検討して、その受容体が疾患進行と相関するかどうかを判断した。しかし、大部分の種類の腫瘍で得られた知見は矛盾するものであり、このことは研究者間で試薬の組み合わせ、手法、病理学的採点法、および細胞種が異なることによると考えられる。腎細胞癌および非Hodgkinリンパ腫は、例外であると思われる。高CD44発現腫瘍を有する患者の生存期間は、その対照となる低または非CD44発現腫瘍を有する患者の生存期間よりも一貫して短かった。

10

#### 【0010】

癌との関連性により、抗癌療法の開発がCD44を標的としておこなわれてきた。CD44の標準型または変異型が腫瘍進行に必要なかどうかについての論争が依然としておこなわれている。両方の観点を指示する生体内動物データがあり、また一方では腫瘍型に依存し、さらには細胞型にも依存すると考えられる。異なる治療的アプローチとして、可溶性CD44タンパク質、ヒアルロン酸・シンターゼcDNA、およびヒアルロニダーゼの注射と、CD44アンチセンスおよびCD44特異抗体の使用とが含まれていた。各々のアプローチは、ある程度の成功をもたらし、それによって抗CD44癌療法に対するサポートが得られた。

20

#### 【0011】

変異体CD44特異的モノクローナル抗体および標準CD44特異的モノクローナル抗体の産生は、実験的におこなわれてきた。しかし、ほとんどの場合、これらの抗体は固有の生物活性を持たず、むしろ該抗体が認識するCD44のタイプに対して特異的に結合する。しかし、一部のものは、生体外または生体内のいずれかで活性を示す（しかし一般に両方で活性を示すことはない）。いくつかの抗CD44抗体が、細胞で生ずる現象を調節することが示された。例えば、ヒト赤血球ルセラン抗原CD44標準型に対するマウス抗体A3D8は、CD(9-1抗体)およびCD(OKT3抗体)媒介T細胞活性化を高めることが示され、別の抗CD44抗体は類似の効果を生じた。A3D8は、単球からのIL-1放出およびTリンパ球からのIL-2放出もおこなう。興味深いことに、ダウノルビシン、ミトキサントロン、およびエトポシド等の薬剤と併用してA3D8の使用は、第二メッセンジャーであるセラミドの生成を抑制することによって、HL60およびNB4AML細胞でのアポトーシス誘導を阻害した。固有の活性を持たずCD44の同様なエピトープに対するJ173抗体は、薬剤誘導アポトーシスを阻害しなかった。85~110kDおよび200kD形のCD44に対するNIH44-1抗体は、CD44の交叉結合または凝集であると著者が推測する経路を介して、T細胞増殖を増強させた。ひとまとめにして考えると、このような抗体が癌に対するもの（例えば、リンパ球の活性化）ではなく、細胞増殖を誘導するものでもなく、あるいは細胞障害性薬とともに使用した際に癌細胞の薬物誘導死をもたらすこともないことから、これらが癌治療を目的とした用途に適しているという証拠はない。

30

40

#### 【0012】

いくつかの抗CD44抗体が生体内(in vivo)で抗腫瘍効果を示すということが記載された。抗体1.1ASML(CD44の変異体に対するマウスIgG1)によってラット膵臓腺癌BSp73ASMLのリンパ節および肺転移が減少することが示されている。処置した動物の生存は、同時に増加した。この抗体は、リンパ節コロニー形成前に投与される場合のみに効果的であり、リンパ節での細胞増殖を妨げた。生体外(in v

50

in vitro)での腫瘍細胞に対する抗体の直接的な細胞障害性は見られず、この抗体によって補体媒体細胞障害性または免疫エフェクター細胞機能が高められることはなかった。ヒト細胞に対する抗体の有用性については、記載されていない。

#### 【0013】

ブレイヤー (Breyer) 他は、同所移植されたラット膠芽腫の進行を中断させるために、CD44に対する市販の抗体を用いることを記載した。ラット膠芽腫細胞系C6を前頭葉に移植し、1週間後、ラットに対して、脳内注射による抗体処置を3回おこなった。処置されたラットでは、腫瘍の増殖減少が示され、また緩衝液またはアイソタイプ対照処置ラットよりも体重が重かった。抗体は、細胞外マトリックス成分によって被覆されたカバーガラスに対する生体外 (in vitro) 細胞接着を阻害することが可能であったが、細胞に対する直接的な細胞障害性効果を有しなかった。この抗体の試験は、ヒト細胞に対してはおこなわれなかった。

10

#### 【0014】

CD44 (IM-7.8) に対する抗体の有効性をCD44v10 (K926) と比較する研究がおこなわれた。高転移性マウス黒色腫B16F10株 (両方のCD44イソ型を発現) がマウスに静脈内移植された。2日後、本研究期間にわたって3日毎に抗体の投与がなされた。両抗体ともに、肺転移の数を50%を上回るほど著しく減少させ、2つの抗体間で有効性の有意な差はみられなかった。抗体は、生体外 (in vitro) での増殖に影響を及ぼさず、著者であるザバズキ (Zabadzki) 他は腫瘍増殖阻害がCD44とそのリガンドとの相互作用を抗体が阻害することによるものと推測した。IM-7.8.1を用いた別の研究では、ザバズキ (Zabadzki) 他は、抗体およびそのF(ab')<sub>2</sub>フラグメントがマウスT細胞リンパ腫LBによってリンパ節浸潤を阻害することが可能であることを証明した。これは、マウスに対して顕著な延命効果を与えた。ヴァラッハ-ダヤン (Wallach-Dayan) 他は、腫瘍を自発的に形成しなLB-TRマウスのリンパ種がCD44v4-10によるトランスフェクションによって腫瘍形成能を与えられたことを示した。IM-7.8.1投与によって、イソ型対照抗体と比べて、移植トランスフェクト細胞の腫瘍サイズが減少した。これらの研究のいずれも、この抗体に関するヒトでの有用性については示されなかった。

20

#### 【0015】

GKW.A3 (マウスIgG2a) は、ヒトCD44に対して特異的であり、SCIDマウスでのヒト黒色腫異種移植の形成および転移を妨げる。この抗体を転移性ヒト細胞系SMMU-2と混合して皮下注射した。処置は、その後3週間にわたって続けられた。4週間後、未処置の動物では100パーセントであるのに比べて、10匹のマウスのうち1匹のみが注射部位で腫瘍を発生させた。抗体のF(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、腫瘍形成を同様に阻害することを示したことから、その作用機序が補体または抗体依存性細胞障害に依存しないことが示唆された。初回抗体注射の1週間前に腫瘍細胞を注射した場合、80パーセントの動物で原発部位に腫瘍が生じた。しかし、留意すべき点は、生存期間が依然として著しく高いということであった。抗体遅延投与が原発腫瘍形成に対して何ら効果を示さなかったことにかかわらず、未処置の動物では存在した肺、腎臓、副腎、肝臓、および腹膜への転移を完全に防いだ。この抗体は、生体外 (in vitro) で上記細胞系に対して直接的な細胞障害性をまったく示さないか、あるいはSMMU-2細胞の増殖を妨げ、さらに転移または増殖に影響を及ぼすことで腫瘍形成に対して大きな効果を有すると思われる。この抗体の1つの顕著な特徴は、それがCD44の全てのイソ型を認識したということであり、このことは治療を目的とした使用の可能性に限界があることを示唆した。

30

40

#### 【0016】

シュトロベール (Strobel) 他は、マウス異種移植モデルでヒト卵巣癌細胞の腹膜移植を阻害するために抗CD44抗体 (クローン515) を用いることを記述している。ヒト卵巣の細胞系36M2を、抗CD44抗体または対照抗体の存在下で、マウスへ腹腔内移植し、その後の20日間にわたって処置薬を投与した。5週間後に、抗体処置群の

50

腹膜腔で小結節の数が著しく少なかった。抗CD44処置群および対照処置群に由来する小結節の大きさは、同じであり、このことは細胞がひとたび移植されると、抗体は腫瘍増殖に対して何ら効果を示さなかったことを示唆した。細胞を皮下移植した場合も腫瘍増殖に対する効果はなく、抗体それ自体が抗増殖または細胞障害性効果を持たないことを示した。また、生体外 (*in vitro*) での細胞増殖に対する抗体の効果はみられなかった。

#### 【0017】

VFF-18 (BIWA1とも表される) は、ポリペプチドの360~3870領域に対して特異的であるCD44のv6変異体に対する高親和性抗体である。この抗体は、12人の患者の第1相臨床試験で<sup>99m</sup>Tcテクネチウム標識複合体として用いられている。この抗体を、頭部および頸部に扁平上皮癌を持つ患者での標的化可能性と安全性とについて、試験した。注射後の40時間、注射投与量の14パーセントが腫瘍に取り込まれ、その際、腎臓、脾臓、および骨髄を含む他の器官での蓄積は最小であった。高度に選択的な腫瘍結合は、この抗体の放射免疫療法での役割を示唆している一方で、この抗体の非常に高い親和性が腫瘍のより深い層への浸透を妨げている。BIWA1の適用をさらに制限するものは、マウス抗体の免疫原性(患者12人中11人にヒト抗マウス抗体(HAMA)が生じた)、腫瘍全体に及ぶ異質性の蓄積、および抗体可溶性CD44複合体の形成である。WO02/094879は、HAMA応答を克服するために設計されたVFF-18のヒト化バージョン(BIWA4と命名)を開示している。BIWA4の抗原結合親和性が親VFF18抗体よりも著しく低いという知見が得られた。驚くべきことに、低親和性BIWA4抗体は、高親和性BIWA8ヒト化VFF-8抗体よりも優れた腫瘍取り込み特性を有した。患者33人に対する第1相臨床試験をおこなうことで、<sup>99m</sup>Tcテクネチウム標識および<sup>186</sup>Reニウム標識BIWA4抗体の安全性、耐容性、腫瘍蓄積、および最大許容投与量(<sup>186</sup>Re標識BIWA4の場合)を評価した。<sup>186</sup>Re標識BIWA4の全ての用量で腫瘍反応がみられなかったにみられなかったけれども、いくつかのものは安定病態を有し、用量規定毒性が60mCi/m<sup>2</sup>で生じた。有害事象率は50~65パーセントであり、患者33人中12人が深刻な有害事象(血小板減少症、白血球減少症、および発熱)を有すると思われ、またそのうちの6人(全員が<sup>186</sup>Re標識BIWA4による処置を受けた)が処置または経過観察の過程で疾患進行により死亡した。<sup>186</sup>Re標識BIWA4の用量を段階的に増量する第1相試験を患者20人に対して実施した。口腔粘膜炎および用量規定血小板減少症および白血球減少症が観察され、1人の患者ではHAA反応が出現した。安定病態は、60mCi/m<sup>2</sup>という最も高い用量で処置された患者5人にみられた。達成される有効性について安全性および耐容性の両方の面から許容可能であると考えられるにもかかわらず、これらの研究は、臨床試験で他の非放射性同位元素併用生物学的療法に比べて、有害事象率が高い。米国特許出願第2003/0103985号は、腫瘍治療を目的として、メタシオイドを抱合させたVFF-18のヒト化バージョン(BIWA4と命名)を開示している。ヒト化VFF18抗体(BIWA4)は、毒素(すなわち、BIWI1)を抱合した場合に、外陰部ヒト扁平上皮細胞癌、咽頭有棘細胞癌、または乳癌のマウス・モデルで顕著な抗腫瘍効果を示すという知見が得られた。非抱合型バージョンであるBIWA4は抗腫瘍効果を示さず、また抱合型バージョンであるBIWI1はヒトでの安全性および有効性に関する証拠を何ら示していない。

#### 【0018】

MabU36は、UM-SCC-22Bヒト下咽頭癌細胞免疫化ならびに癌および組織特異性に対する選択性によって得られたマウス・モノクローナルIgG1抗体である。cDNAクローニングおよび配列分析を通しての抗原特徴付けは、ケラチノサイト特異的CD44スプライス変異体エピカンのv6領域をMabU36の標的として特定した。免疫組織化学的検査では、このエピトープが細胞膜に限定されていることが示された。さらに、MabU36は、頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)の94%を強く標識し、またこの腫瘍内で均一な細胞染色がみられた。患者10人の<sup>99m</sup>Tc標識MabU36を検査したところ、HNSCC癌に対する抗体の選択的蓄積(2日間で20.4±12.4パーセン

10

20

30

40

50

ト注入量 / k g ) がみられ、副作用は報告されていないが、患者 2 人に H M A A が発症した。放射性ヨウ素標識マウス M a b U 3 6 の検査では、患者 1 8 人中、H A M A の症例が 3 件あり、選択的かつ一様な H N S C C への取り込みがみられた。M a b U 3 6 の抗原性を低下させるとともに H A M A の率を低下させるために、キメラ抗体が作られた。キメラおよび本来のマウス M a b U 3 6 は、いずれも A D D C 活性を示さなかった。M a b U 3 6 が持つ本来の機能活性に関する証拠はみられない。この第 1 相試験では、投薬量増量治療患者 1 3 人に対して、探索量の 9 9 m T c 標識キメラ M a b U 3 6 が与えられ、続いて 1 8 6 R e 標識キメラ M a b U 3 6 が投与された。急性有害事象の報告はなかったが、後処置投与量を制限する骨髄毒性 ( 1 . 5 G B q / m 2 ) が患者 3 人のうち 2 人にみられ、また最大許容投与量 ( 1 . 0 G B q / m 2 ) による処置を受けた 1 人の患者に血小板減少症が認められた。腫瘍サイズに対して多少の効果があつたにもかかわらず、これらの効果は処置に対する他感的応答基準を満たすものではなかった。1 8 6 R e 標識キメラ M a b U 3 6 に関するさらなる研究は、顆粒球コロニー刺激因子刺激全血返血という戦略を利用して最大耐容活性を 2 . 8 G y に倍化させた。頭頸部に種々の腫瘍を持つ患者 9 人に対するこの研究で、3 人が薬物関連貧血症のために輸血を必要とした。他の毒性として、重度 ( グレード 3 ) の骨髄毒性および中等度 ( グレード 2 ) の粘膜炎が挙げられる。安定病態が 5 人の患者で 3 ~ 5 ヶ月間達成されたにもかかわらず、客観的腫瘍反応は既報告でなかった。したがって、わかることは、M a b U 3 6 が非常に特異的な抗体であるにもかかわらず、抗癌効果を達成するために放射性免疫複合体を必要とすることが障害になって、その有益性が制限されることであり、その理由として、達成される臨床効果に関連して治療に伴う毒性がある。

10

20

## 【 0 0 1 9 】

要約すると、C D 4 4 v 6 ( 1 . 1 A S M L ) および C D 4 4 v 1 0 ( K 9 2 6 ) モノクローナル抗体は、それぞれ、転移性膵臓腺癌を注射されたラットまたは悪性黒色腫を注射されたマウスの転移活性を減少することが示されている。別の抗 C D 4 4 v 6 抗体 ( V F F - 1 8 とその誘導体 ) は、メイタンシノイドまたは放射性同位元素に抱合される場合のみに、抗腫瘍効果を有することが示された。抗標準 C D 4 4 モノクローナル抗体は、ラット・グリア芽細胞腫 ( 抗 C D 4 4 ) による大脳内進行、マウス T 細胞リンパ腫によるリンパ節浸潤 ( I M - 7 . 8 . 1 ) を抑制すること、同様にヌードマウス ( クローン 5 1 5 ) でのヒト卵巣癌細胞系の移植、マウス・メラノーマ細胞系の肺転移 ( I M - 7 . 8 . 1 ) 、および S C I D マウス ( G K W . A 3 ) でのヒト・メラノーマ細胞ラインの転移を阻害することが明らかになった。放射性同位元素結合 M a b U 3 6 抗 C D 4 4 v 6 抗体およびその誘導体は、臨床試験で、顕著な毒性を伴う抗腫瘍活性を有した。これらの結果は、彼らを励ますとともに可能性のある癌療法としての抗 C D 4 4 モノクローナル抗体の開発を支持したにもかかわらず、ヒト癌に対する有効性、安全性、および適用性に限界があることを示している。

30

## 【 0 0 2 0 】

したがって、癌細胞障害性を調節する抗体組成物が単離されるならば、癌細胞上の C D 4 4 の細胞表面発現に対するその親和性の効用として、有益な診断および治療方法が実現されるだろう。

40

## 【 0 0 2 1 】

従来技術

特許文献 1 は、患者腫瘍由来の細胞に M H C 遺伝子を形質移入するプロセスを開示しており、この M H C 遺伝子はその患者の細胞または組織からクローニングすることが可能である。

## 【 0 0 2 2 】

特許文献 2 は、ほ乳類の腫瘍性および正常細胞の細胞内構成要素に対して特異的であり、細胞外構成要素に対しては非特異的であるモノクローナル抗体を得る工程と、そのモノクローナル抗体を標識する工程と、標識された抗体と腫瘍性の細胞を殺すための治療を受けたほ乳類の組織とを接触させる工程と、変性腫瘍細胞の細胞内構成要素に対する標識抗

50

体の結合を測定することによって治療の効果を決定する工程とを含むプロセスを開示している。ヒト細胞内抗原に対する抗原を調製している際に、特許権者は悪性細胞がそのような抗原の便利な供給源であることを認識する。

【0023】

特許文献3は、新規な抗体とその生産方法とを提供する。詳しくは、この特許は、ヒト腫瘍（例えば、大腸および肺の腫瘍）に関連したタンパク質抗原と強固に結合し、その一方で正常細胞への結合の度合いがかなり低いという性質を持つモノクローナル抗体の形成を教示している。

【0024】

特許文献4は、癌治療のための方法を提供するもので、この方法は、ヒト癌患者から腫瘍組織を外科的に除去すること、腫瘍組織を処理することで腫瘍細胞を得ること、腫瘍細胞に放射線を照射することで、生存可能ではあるが非腫瘍形成性にする、ならびにこれらの細胞を用いて、原発性腫瘍の再発を妨げると同時に転移を阻止することが可能な患者用アクチンを調製することを含む癌治療の方法を提供する。この特許は、モノクローナル抗体の開発を教示しており、このモノクローナル抗体は腫瘍の表面抗原に対して反応する。第4段落45行目（以下参照）に記載されているように、特許権者は、ヒト腫瘍形成で有効かつ特異的な免疫治療を示すモノクローナル抗体の開発で自所性の腫瘍細胞を利用する。

10

【0025】

特許文献5は、ヒト上皮性悪性腫瘍に特有であり、かつそれが由来する上皮組織に依存しない糖タンパク質抗原を教示している。

20

【0026】

特許文献6は、Her2発現細胞でアポトーシスを誘導する抗Her2抗体、該抗体を産生するハイブリドーマ細胞系、上記抗体を用いて癌を処置する方法、および上記抗体を含む医薬組成物に関する。

【0027】

特許文献7は、精製されたムチン抗原に対するモノクローナル抗体を生産するための新規ハイブリドーマ細胞系を記載している。

【0028】

特許文献8は、所望の抗原に特異的な抗体を産生するヒトリンパ球を生産する方法、モノクローナル抗体を生産する方法、およびこの方法によって生産されるモノクローナル抗体に関する。この特許は、特に癌の診断および処置に有用な抗HDヒト・モノクローナル抗体の生産に関する。

30

【0029】

特許文献9は、抗体、抗体フラグメント、抗体複合体、およびヒト上皮性悪性腫瘍細胞と反応する単鎖免疫毒素に関する。これらの抗体作用が2倍になるメカニズムは、ヒト癌の表面に存在する細胞膜抗原と反応する点で、また抗体は癌細胞内に内在化する能力を持つという点であり、結合の後で、抗体薬物複合体および抗体毒素複合体の形成に特に有用となる。未修飾形態では、抗体もまた、特定の濃度で細胞障害性を発現する。

【0030】

特許文献10は、腫瘍の治療および予防に自己抗体を使用することを開示している。しかし、この抗体は、老いたほ乳類の抗核抗体である。この場合、自己抗体は、免疫系で見いだされる自然抗体の一種であると考えられる。なぜなら、自己抗体は「老いたほ乳類」に由来し、自己抗体が実際に、処置している患者に由来することを必要とはしない。また、この特許は老いたほ乳類に由来する天然またはモノクローナル抗核自己抗体とモノクローナル抗核自己抗体を産生するハイブリドーマ細胞系とを開示している。

40

【0031】

特許文献11は、CD44遺伝子の変異体エクソンv6に対する特異的抗体（VFF-18）とその変異体とを開示している。この抗体は、ラットCD44v6変異体よりもむしろヒトCD44v6変異体を認識するという点で、コンパレータ抗体をしのぐ改善で

50

ある。さらに、この抗体は、CD44v6発現のための診断アッセイを開示する。この抗体に関して、生体外 (*in vitro*) または生体内 (*in vivo*) での作用はみられなかった。

【0032】

特許文献12は、CD44遺伝子のヒト・エクソン6Aによりコードされる配列を含む合成ペプチドに対して産生されたモノクローナル抗体Ver3.1を開示している。詳しくは、この抗体はヒトCD44の90kD形に結合せず、Hermes-3抗体と区別される。CD44のv6変異体を検出する方法を提供するとともに、この抗原に基づく悪性転換をスクリーニングして評価するための方法を提供する。血清中の抗原の検出に基づいて免疫疾患をスクリーニングするための方法も提供する。

10

【0033】

特許文献13は、43アミノ酸ペプチドを産生するヒトCD44変異体6の129bpエクソンに結合する特異的抗体を開示している。このモノクローナル抗体は、いくつかのハイブリドーマ細胞系、すなわちMAK<CD44>M-1.1.12、MAK<CD44>M-2.42.3、およびMAK<CD44>M-4.3.16によって産生される。この抗体は、新規CD44v6アミノ酸配列の少なくともヘキサペプチドを含む融合タンパク質から生ずる。さらに、癌診断に使用し得るエクソン6変異体を検出するための免疫アッセイが開示されている。注目すべきことは、開示されたこの抗体の生体外および生体内作用はみられない。

【0034】

特許文献14は、CD44様ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、このポリヌクレオチドおよびその変異体を用いて組み換えタンパク質を作る方法とを開示している。これらのポリペプチドに対して抗体がクレームされているが、具体例はなく、またそのような抗体を分泌する寄託されたクローンもない。ノーザン・プロットは、いくつかの種類の組織でポリヌクレオチドの出現を示しているが、このポリヌクレオチドの翻訳および発現に付随する証拠は挙げられていない。したがって、このポリペプチドの遺伝子産物に対して作られた抗体(該抗体は生体外または生体内作用を有すると思われる)が存在していたという証拠はなく、また該抗体がヒトの癌疾患に関連していると考えられる証拠もない。

20

【0035】

特許文献15は、CD44の変異体エピトープと反応する抗体と該抗体を用いて変異体を同定する方法とを開示している。この変異体をコードする単離ポリペプチドはラット細胞から単離されたもので、この変異体に対する抗体(mAb1.1ASML)は、分子量120kD、150kD、180kD、および200kDのタンパク質を認識する。モノクローナル抗体1.1ASMLの投与は、同系ラットでのラットBSp73ASMLの増殖および転移を遅らせた。注目すべきことに、1.1ASMLは、LCLC97ヒト大細胞肺癌に対する反応性が欠けていたことに示されるように、ヒト腫瘍を認識しない。ヒト・ホモログはLCLC97から単離されるが、このホモログを認識する等価な抗体は産生されなかった。したがって、ラットCD44の変異体に特異的な抗体が作られ、ラット腫瘍の増殖および転移に影響を及ぼすことが示された。より具体的には、本発明者らはこの抗体がヒト癌を認識しないことを指摘している。

30

40

【0036】

【特許文献1】米国特許第5,750,102号公報

【特許文献2】米国特許第4,861,581号公報

【特許文献3】米国特許第5,171,665号公報

【特許文献4】米国特許第5,484,596号公報

【特許文献5】米国特許第5,693,763号公報

【特許文献6】米国特許第5,783,186号公報

【特許文献7】米国特許第5,849,876号公報

【特許文献8】米国特許第5,869,268号公報

50

- 【特許文献 9】米国特許第 5, 869, 045 号公報
- 【特許文献 10】米国特許第 5, 916, 561 号公報
- 【特許文献 11】米国特許第 5, 780, 033 号公報
- 【特許文献 12】米国特許第 5, 616, 468 号公報
- 【特許文献 13】米国特許第 5, 879, 898 号公報
- 【特許文献 14】米国特許第 5, 942, 417 号公報
- 【特許文献 15】米国特許第 5, 885, 575 号公報

【発明の開示】

【0037】

既に本発明者らは、癌疾患の処置に有用である個々にカスタマイズされた抗癌抗体を選択するためのプロセスに対する「個別的患者特異的抗癌抗体」と題された米国特許第 6, 180, 357 号を既に交付されている。この文献の目的のために、用語「抗体」および「モノクローナル抗体」(mAb)を同義的に用いることが可能であり、ハイブリドーマ(例えば、マウスまたはヒト)、免疫複合体、さらに必要に応じて、免疫グロブリンのフラグメントおよび該免疫グロブリンに由来する組み換え体タンパク質によって生産される完全な免疫グロブリンのことをいい、例えばキメラおよびヒト化免疫グロブリン、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、単鎖抗体、組み換え体免疫グロブリン可変領域(Fv)、融合タンパク質が挙げられる。タンパク質の構造または機能に有意な効果を生ずることなく、一部のアミノ酸配列がポリペプチド内で変異し得ることは、当該技術分野で十分に理解されている。抗体の分子内転位では、一般に、主鎖領域の核酸またはアミノ酸配列を修飾し得る。このような修飾の例として、限定されるものではないが、置換(好ましくは保存的置換)、欠失、または付加が挙げられる。さらに、標準的な化学療法のための手段(例えば、放射性核種)と本発明のCDMABとを抱き合わせることは、この発明の範囲内であり、このことから上記化学療法剤の使用に注目する。CDMABもまた、毒素、細胞毒部位、酵素(例えば、ピオチン複合酵素)、または造血細胞と結合することができ、それによって抗体複合体が形成される。

【0038】

この出願は、実質的に、癌疾患修飾モノクローナル抗体をコードするハイブリドーマ細胞系の単離を目的とした「357号特許に教示されたような患者特異的抗癌抗体を生産するための方法」を利用する。これらの抗体を、1つの腫瘍に対して特異的に作ることができるので、癌治療をカスタマイズすることが可能となる。この出願の文脈の中で、細胞殺害(細胞障害性)または細胞増殖阻害(細胞増殖抑制性)特性のいずれかを持つ抗癌抗体を以下、細胞障害性という。これらの抗体を癌の病期分類および診断の補助として用いることができ、また原発腫瘍と同様に腫瘍転移を処置するために用いることができる。

【0039】

個別の抗癌処置の見込みは、患者を管理する方法の変化をもたらす。可能性のある臨床シナリオは、腫瘍試料が提示に得られて積み上げられることである。この試料から、既存の癌疾患修飾抗体パネルにより腫瘍の型を決めることができる。患者の病期分類を従来どおりに行うけれども、利用可能な抗体を患者のさらなる病期分類に用いることができる。患者に対して既存の抗体を用いて迅速な処置を施すことができ、および/または腫瘍に特異的な抗体パネルを、本明細書中に概説された方法を用いることで、あるいは本明細書中に開示されたスクリーニング方法と同時にファージ・ディスプレイ・ライブラリーを用いることを介して、生産することができる。産生された抗体の全てを抗癌抗体ライブラリーに加える。他の腫瘍が処置したものと同様のエピトープのいくつかを所有することが可能である。この方法にもとづいて産生される抗体は、該抗体に結合する癌を持つ患者の多くで癌疾患を処置するのに有用であると思われる。

【0040】

実質的に米国特許第 6, 180, 357 号を用いることで、患者の肺腫瘍生検から得た細胞によるマウスの免疫化の後に、マウス・モノクローナル抗体 H460-16-2 を得ることができた。H460-16-2 で抗原は、異なる組織起源からヒト細胞系の幅広い

範囲の細胞表面の上で発現された。乳癌細胞系最低降下高度 - MB - 231 (MB - 231) と皮膚癌細胞系 A2058 は、そうであった生体外で H460 - 16 - 2 の細胞障害効果に感受性である。マウス (S.N. 10/603, 000 で開示されるように) に移植されるとき、培養の MB - 231 細胞に対する H460 - 16 - 2 で細胞障害性の結果はこれらの癌細胞の方へその抗腫瘍活性によってさらに広げられた。

#### 【0041】

症状発現前異種移植腫瘍モデルは、治療効力の有効な予言者と考えられる。ヒト乳癌の予防的生体内モデルで、H460 - 16 - 2 で処置はアイソタイプ対照抗体より、治療期間の間に腫瘍増殖を抑制することに有意に効果的だった ( $p < 0.001$ )。そして、それは構造とサイズの H460 - 16 - 2 と同一だったが、結合 MB - 231 の細胞ができなかつた。処置相終了後、H460 - 16 - 2 を与えられるマウスは、対照群のわずか 1.3 パーセントに増大した腫瘍を有した。後処理追跡調査期間の間に、H460 - 16 - 2 の処置効果は維持された、そして、投与群の平均の腫瘍容積は測定相の末端までの対照よりかなり少なくし続けた。抗体有効性の基準として生存を使用して、H460 - 16 - 2 で投与群で死亡する危険が 70 日後処理の抗体バッファ制御群 ( $p = 0.028$ ) の約 71 パーセントであると推定された。これらのデータは、H460 - 16 - 2 で処置が対照治療をうけている群と比較して延命効果を与えることを証明した。それが還元型体重と臨床苦痛を含む毒性のいかなる合図も誘導しなかつたので、H460 - 16 - 2 で処置は安全に見えた。このように、それが腫瘍増殖を遅延させて、ヒト乳癌の十分確立されたモデルで対照治療をうけている群と比較して生存を強化したので、H460 - 16 - 2 で処置は有効だった。加えて、H460 - 16 - 2 は、確立した生体内腫瘍モデル (S.N. 10/603, 000 で概説されるように) で、MB - 231 細胞に対して抗腫瘍活性を示した。H460 - 16 - 2 による処置は比較された標準的化学療法薬 (シスプラチン) であった、そして、シスプラチンと H460 - 16 - 2 で投与群がいずれの抗体希釈剤緩衝液もまたはアイソタイプ対照抗体を用いた治療を受ける群と比較して有意により少ない平均の腫瘍容積を有する ( $p < 0.001$ ) ことを示された。H460 - 16 - 2 で処置はとても重要な (19.2 パーセント) 減量 ( $p < 0.003$ ) と臨床苦痛のない以外シスプラチン化学療法の約 3 分の 2 であった腫瘍抑制を調節した。

#### 【0042】

そして、2 つの処置関連死亡を含んだ。そして、シスプラチン処置で観察された。H460 - 16 - 2 の抗腫瘍活性とその軽微な毒性は、それに魅力的な抗癌治療薬を作る。後処理期間に、H460 - 16 - 2 で群で死亡する危険が > 70 日後処理でアイソタイプ対照抗体群でその半分についてであったので、H460 - 16 - 2 は重要な延命効果 ( $p < 0.02$ ) を示した。観察された延命効果は、アイソタイプ対照の 100 パーセントと治療をうけているマウスが有したシスプラチンが H460 - 16 - 2 で投与群の 67 パーセントと比較して死亡した過去 120 日後処理を続けた。H460 - 16 - 2 は、アイソタイプ対照抗体群と比較して、26 パーセント遅延腫瘍増殖によって腫瘍抑制を維持した。31 日後処理で、H460 - 16 - 2 はアイソタイプ対照群と比較して 48 パーセント還元性の腫瘍増殖によって腫瘍サイズを制限した。そして、それは処置終了後観察される 49 パーセントの減少と同等である。乳癌の確立した腫瘍モデルにおいて、これらの結果は処置相を越えて腫瘍抑制を維持するために H460 - 16 - 2 の可能性を示して、全身腫瘍組織量を減らす抗体の能力を示して、哺乳類で生存を強化する。乳癌の確立した生体内腫瘍モデルの薬効に加えて、化学療法薬 (シスプラチン) と結合する H460 - 16 - 2 で処置は、確立した生体内前立腺癌の - 3 の細胞がモデル化する PC に対して、抗腫瘍活性を有した。ペアード t - 検定、H460 - 16 - 2 + シスプラチン処置を使用することは、バッファ制御 ( $p < 0.0001$ )、シスプラチン処置 ( $p = 0.004$ ) 単独または H460 - 16 - 2 で処置 ( $p = 0.0001$ ) 単独より、治療期間の直後に腫瘍増殖を抑制することにより効果的だった。処置相終了後、H460 - 16 - 2 + シスプラチンを与えられるマウスは、バッファ制御群のわずか 28.5 パーセントに増大した腫瘍を有した。PC - 3 SCID 異種移植モデルのために、体重が疾患進行の代わりに指標と

10

20

30

40

50

して使われることができる。全ての群のマウスは、重篤な減量を経験した。この研究において、全ての群のマウスは、治療期間末までには約23～35パーセントの減量を示した。

#### 【0043】

H460-16-2による治療群は、減量(21.7パーセント)で最も少ない程度を示した。処置(日48)の後、H460-16-2とシスプラチンの処置と関係している重要な増量損失が、割にパツファ制御( $p = 0.5042$ )になかった。このように、それがヒト前立腺癌の十分確立されたモデルでアイソタイプ対照投与群と比較して腫瘍増殖を遅延させたので、H460-16-2さらにシスプラチン処置は有効だった。薬物標的としてH460-16-2でエピトープを確認するために、正常な人体組織のH460-16-2で抗原の発現は、以前決定された(S.N. 10/603, 000)。本研究は、抗CD44抗体と比べると広げられた; L178(S.N. 10/647, 818で概説される)のクローンをつくって、BU75(本明細書中に概説される)のクローンをつくりなさい。H460-16-2によるIHC染色によって、大部分の組織は、不可欠な器官(例えば肝臓、腎臓(管状上皮細胞の縁の染色を除いて)、心臓と肺)の細胞を含むH460-16-2で抗原を発現するのに失敗した。組織染色からの結果は、H460-16-2が種々の細胞型に制限された結合を見せるが、マクロファージ、リンパ球と線維芽細胞を浸透させることに結合を有することを示した。BU75抗体は、類似の染色パターンを示した。しかし、重要な少なくとも1つの違いが、あった; リンパ球の染色は、H460-16-2まで割にBU75でより強度だった。H460-16-2で抗原で、母集団(乳癌患者の間たとえば~など)内のその有病率がH460-16-2の治療的な使用を評価して、効果的臨床試験を設計する際に重要であると決定している限局化。癌患者から乳房腫瘍でH460-16-2で抗原発現に対処するために、50人の個体乳癌患者からの腫瘍組織試料は、以前H460-16-2で抗原(S.N. 10/603, 000)の発現のためにスクリーニングされて、L178(S.N. 10/647, 818)と比較してあった。現在の仕事は、H460-16-2の染色をBU75と抗Her2抗体c-erbB-2と比較した。本研究の結果は、前の結果と類似していて、73パーセントの乳房腫瘍組織はBU75エピトープが陽性の間、62パーセントの組織標本がH460-16-2で抗原のために良い面を染色したことを示した。染色が悪性細胞に制限されたので、患者試料の範囲内のH460-16-2の発現は癌細胞のために特異的に見えた。BU75が8にしみをつける間、H460-16-2は乳癌患者から正常組織の10の試料のうちの4つにしみをつけた。H460-16-2とBU75抗原の乳房腫瘍発現は主に悪性細胞の細胞膜に局所化されると思われた。そして、治療のためにCD44に魅力的な標的を作った。H460-16-2で発現はホルモン類エストロゲンとプロゲステロンのために受容体の乳房腫瘍発現に基づいてさらに評価された。そして、それは開発、処置と乳房腫瘍の予後において重要な役割を果たす。相互関係は、どちらのエストロゲンもまたはプロゲステロンのためにH460-16-2で抗原の発現と受容体の発現の間で明瞭でなかった。腫瘍が基づかれて分析された、それら病期分類する、または癌が進んだ程度、また、H460-16-2で抗原発現と腫瘍の病期間のはっきりした相互関係が、なかった。同様の結果がBU75で得られた。c-erbB-2に対する比較において、H460-16-2は、H460-16-2で抗原が陽性だった乳房腫瘍組織標本の52パーセントが乳癌患者のこれまでに会ったことのない標的にされた治療的な必要を示しているHer2発現が陰性だった完全に異なる染色プロフィールを示した。

#### 【0044】

染色の強度の違いが、H460-16-2とHer2が陽性だった乳房腫瘍組織切片の間にもあった。c-erbB-2抗体も、明らかに正常な乳房組織切片のうちの1つを染色した。さらにH460-16-2の潜在的治療上の利益を延長するために、種々のヒト癌組織の範囲内の抗原の周波数と限局化は、以前決定されもし(S.N. 10/603, 000)で、クローンL178(S.N. 10/647, 818)と比較してもあった。大部分のこれらの腫瘍タイプは、L178抗原が陽性でもあった。ヒト乳房腫瘍組

10

20

30

40

50

織、H460-16-2とLと同様に、178の限局化は、腫瘍細胞の膜に起こった。しかし、実質的により多くの膜限局化が、H460-16-2抗体と比較して、L178であった。また、H460-16-2とL178によってしみをつけられた腫瘍タイプの、組織の43パーセントは、178の抗体にLで色付けしている高等強度を示した。必ずしも文献からIHCデータで比較に基づいてこの中に示されるIHCデータにマッチするCD44の形状でなく見える。CD44の標準形は、ヒト脳で通常発現される；H460-16-2で抗原は、そうでない。汎CD44アイソフォームに向けられる抗体は、肝臓を染色しない。(Kupffer細胞を含む)、そして、生殖周期の全ての相で、子宮内膜腺を明らかに染色しなさい。H460-16-2で抗原は、Kupffer細胞の上で明らかにあって、生殖周期の分泌子宮内膜腺の上であるだけである。H460-16-2で抗原は組織マクロファージの上で明らかにある。また、変異体だけはV4/5を形成する。また、V8/9は随時のマクロファージ染色を示す。抗CD44 L178と現在BU75に比較でH460-16-2で見られる類似であるが、異なった結合パターンは、H460-16-2で抗原がCD44のユニークなエピトープであることを示す。以前に概説される(S.N. 10/647, 818)ように、付加的な生化学データもH460-16-2によって認められる抗原がCD44の形状のうちの一つであることを示した。これは、CD44に対して反応性モノクローナル抗体(L178)が免疫沈降によってH460-16-2に結合していたタンパク質を同定することを示した研究で支えられた。ウエスタンブロッティング研究も、H460-16-2によって認識されるCD44のエピトープがv6またはv10の上でないことを示唆した。H460-16-2でエ

10

20

#### 【0045】

これらのIHCと生化学結果は、そのH460-16-2で結合をCD44抗原の変異体に示した。このように、証拠の優越性はH460-16-2がCD44の変異体の上であるユニークな炭水化物従属する立体配置的エピトープの連結反応を通して抗癌効果を調節することを示した。この発明の目的で、モノクローナル抗体で結合にその能力によって特徴づけられる「CD44抗原性部位」がハイブリドーマ細胞系H460-16-2、その抗原性の結合フラグメントまたはその抗体複合体によってコードしたので、前記エピトープは所定である。H460-16-2の抗癌効果の後でさらに機構を説明するために、ヒアルロン酸(HA)結合実験は、実行された。『H460-16-2の1.87の(+/-1.01)  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の平均濃度が、HAに最低降下高度-MB-231細胞の50パーセントの癒着を得ることを要求されたと決定されたこれらの結果は、少なくとも一つには、H460-16-2がHAに結合の原因となって、従って電子逆探装置を通して新脈管形成または腫瘍侵襲性のダウンレギュレーションを通してその抗癌効果を説明していることができたCD44の上で領域(s)で相互作用することを示した。HA結合実験に加えて、細胞循環実験は、H460-16-2で生体外で生体内抗癌効果が細胞周期の調節によったかどうか決定するために実行された。24時間後に、そして、H460-16-2の20の  $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、最低降下高度-MB-231プログラム死細胞の数の増加が、割にアイソタイプ対照にあった。この効果も、従属する投与量であると思われた。したがって、H460-16-2の有効性は、そのプログラム死誘導している能力に対する与えられべきもの(全体または一部の)でもあるかもしれない。全体として、このデータは、H460-16-2で抗原が癌関連抗原であって、ヒトで発現されて、病的関連した癌標的であることを証明する。さらに、このデータもH460-16-2で抗体の結合をヒト癌組織に示して、診断に役立つことがありえるか、治療を予示することがありえるか、予後でありえるアッセイのために、適切に使われることができる。加えて、この抗原の細胞膜限局化は大部分の非悪性の細胞で抗原の発現の欠如による細胞の癌状態で表示、そして、この診察によってこの抗原、その遺伝子または誘導體、そのタンパク質またはその変異体の使用が診断に役立つことがありえるか、治療を予示することがありえるか、予後でありえるアッセイのために使われることができる。他の研究は、抗CD44抗体の使

30

40

50

用を含んで、H 4 6 0 - 1 6 - 2 によって示されない治療的な可能性の限定を有する。

【 0 0 4 6 】

H 4 6 0 - 1 6 - 2 は、生体外で生体内抗腫瘍活性を示す。前述した抗体はそのような M A K < C D 4 4 > M - 1 . 1 . 1 2 である、M A K < C D 4 4 > M - 2 . 4 2 . 3 と M A K < C D 4 4 > M - 4 . 3 . 1 6 はそれらのものとされる生体外であるか生体内細胞障害性と V F F - 1 8 を有しない、そして、M a b U 3 6 は固有の腫瘍細胞障害性を示さない。加えて、示された生体内腫瘍効果も有する他の抗 C D 4 4 抗体は、H 4 6 0 - 1 6 - 2 で明白でないある種の限界を有する。例えば、A S M L 1 . 1、K 9 2 6、抗 C D 4 4 s と I M - 7 8 . 1 は、それぞれ異種移植モデルで大きくなるラット、マウス、ラットとマウスの腫瘍に対して生体内抗腫瘍活性を示す。H 4 6 0 - 1 6 - 2 は、ヒト癌のモデル 10  
で、抗腫瘍活性を示す。A S M L 1 . 1 のような抗体がラット C D 4 4 だけを認識する間、H 4 6 0 - 1 6 - 2 はヒト C D 4 4 にも向けられる。クローン 5 1 5 抗 C D 4 4 抗体は、人間の卵巣の細胞系の腹膜腫瘍移植を阻害するが、腫瘍増殖を予防しないか、阻害する。

【 0 0 4 7 】

H 4 6 0 - 1 6 - 2 は、重症複合性免疫不全マウス異種移植モデルでヒト乳房腫瘍増殖を阻害することができる。G K W . A 3 は、中でマウスで大きくなる人間の転移性の黒色腫の腫瘍増殖を阻害することができる抗ヒト C D 4 4 モノクローナル抗体である予防的 20  
確立したモデルでない以外の。H 4 6 0 - 1 6 - 2 は、ヒト乳癌の予防的で確立したマウスの異種移植モデルで、示された重要な抗腫瘍活性を有する。従って、H 4 6 0 - 1 6 - 2 が前述した抗 C D 4 4 抗体に割に優れた抗腫瘍特性を有することは、全く明瞭である。それは重篤複合免疫不全マウスでヒト乳房腫瘍に関して示された生体外で生体内抗腫瘍活性を有して、ヒト C D 4 4 に向けられる。それもヒト乳癌の予防的で確立した（より臨床的に関連する）モデルで活性を示す、そして、それはヒト前立腺癌の確立したモデルでシスプラチンで活性を示す。全部で、この発明は、治療薬のために標的として H 4 6 0 - 1 6 - 2 で抗原の使用を教える。その投与される、哺乳類（このように遅延疾患進行）で抗原を発現している癌の全身腫瘍組織量を減らすことができ、そして、治療をうけている哺乳類の生存延長に導くこともできる。この発明も C D M A B ( H 4 6 0 - 1 6 - 2 で ) とその誘導体の使用を教える。また、哺乳類で抗原を発現している癌の全身腫瘍組織量を 30  
減らして、この抗原を発現する腫瘍を運んでいる哺乳類の生存を延長するためにその抗原を標的にする。加えて、この発明は、その抗原に対する結合の後、H 4 6 0 - 1 6 - 2 はヒアルロン酸で相互作用する癌細胞の能力に干渉することができて、癌細胞がアポトーシスを受ける原因になることもありえることを教える。

【 0 0 4 8 】

さらにまた、この発明も、診断のために有用でありえる癌細胞で H 4 6 0 - 1 6 - 2 で抗原を検出する効果、治療の予測とこの抗原を発現する腫瘍を運んでいる哺乳類の予後を教える。患者が治療の最初のコースに不応性の、または、転移が出現する場合、腫瘍に対する創成特異抗体のプロセスは再治療のために繰り返されることができる。さらにまた、抗癌抗体はその患者から得られる赤血球に抱合されることができて、転移の処置のために再注入されることができて、ほとんど効果的処置が転移癌のためになかった、そして、転 40  
移は通常、死に帰着している転帰不良を予告する。しかし、転移癌は通常ウェル血管化のである。また、赤血球による抗癌抗体の送達は腫瘍の部位で抗体に集中する効果を有することができる。転移の前にさえ、大部分の癌細胞はそれらの生存のために宿主の血液供給に依存している。また、赤血球に抱合される抗癌抗体は同様に元の位置の腫瘍に対して効果的でありえる。あるいは、抗体は他の血液原細胞、例えばリンパ球、マクロファージ、単球、ナチュラルキラー細胞、その他に抱合されることができて、また、T h e r e は抗体の 5 つのクラスである。また、各々はその H 鎖によって与えられる機能と関係している。裸の抗体による癌細胞殺害が抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 ( A D C C ) または補体依存性細胞障害作用 ( C D C ) を通して調節されると通常、思われる。例えば、マウスのマクログロブリンと I g G 2 a 抗体は、結合によってヒト補体を活性化させることができる 50

それによって、腫瘍細胞溶解に導くことができる補体活性化の古典経路を活性化させている補体系のC I構成要素。ヒト抗体のために、最も効果的補体活性化させている抗体は、通常、マクログロブリンとI g G 1である。I g G 2 aとI g G 3アイソタイプのマウスの抗体は、単球、マクロファージ、顆粒球とある種のリンパ球によって細胞殺害に導くFcレセプタを有する細胞傷害性細胞を補充することで効果的である。I g G 1とI g G 3アイソタイプのヒト抗体は、A D C Cを調節する。抗体調節された癌殺害のもう一つの可能な機構が、細胞膜とその関連糖タンパク質または糖脂質で(いわゆる触媒抗体)種々の化学結合の加水分解に触媒作用を及ぼすために機能する抗体を用いることによりあることができる。より広く認められる抗体調節された癌細胞殺害のさらに2つの機構が、ある。第一は、癌細胞にある推定上抗原に対して免疫反応を生産するために身体を誘発するワクチンとしての抗体の使用である。事実上その機能が失われるように、第2は増殖受容体を標的にして、それらの機能に干渉するか、減少してその受容体を調整する抗体の使用である。したがって、方法を同時に、それについて前記ハイブリドーマ細胞系がコードされるハイブリドーマ細胞系と対応する単離した単クローン抗体と抗原結合フラグメントを単離するために、非癌細胞に比較的無毒性間、癌細胞に関する細胞障害性である特定の個体に由来する細胞から癌疾患修飾抗体を生産することのために利用することは、本発明の目的である。単離したモノクローナル抗体を利用する方法を教えることは本発明の更なる目的である、または、その抗原結合フラグメントは特に単離したモノクローナル抗体に対する結合またはその抗原結合フラグメントがP T A - 4 6 2 1としてA T C Cで寄託されたクローンによってコードしたC D 4 4抗原性部位を発現する細胞の存在を決定するためにP T A - 4 6 2 1としてA T C Cで寄託されたクローンによってコードした。単離したモノクローナル抗体の使用を経て癌疾患を有している患者の生存を強化する方法を教えることはまだ本発明の更なる目的である、または、その抗原結合フラグメントはP T A - 4 6 2 1としてA T C Cで寄託されたクローンによってコードした、そしてそれは、抗体が特にC D 4 4抗原性部位に対する結合である。それは、C D M A Bを教える本発明とその抗原結合フラグメントの更なる目的である。細胞障害性がA D C Cを通して調節されるC D M A Bを生産することは、本発明の更なる目的である。細胞障害性がC D Cを通して調節されるC D M A Bを生産することは、まだ本発明の更なる目的である。細胞障害性が細胞化学結合の加水分解に触媒作用を及ぼすそれらの能力の機能であるC D M A Bを生産することは、まだ本発明の更なる目的である。本発明のなお更なる目的は、診断、予後と癌のモニタリングのために結合実験で有用であるC D M A Bを生産することである。この発明の他の目的と長所は、そこで以下の説明から明らかになる、

10

20

30

#### 【0049】

(図面の説明)

図および実施例(この発明のいくつかの実施形態)のために、述べる。特許または帯出者登録簿が色で仕上げられる最低1つの図面で含む図面の簡単な説明。この特許のコピーまたはカラー図面による特許出願刊行は、要請と必要な料金の支払いに応じて局によって提供される。

図1は、正常な人体組織アレイから扁桃の組織切片の上でH 4 6 0 - 1 6 - 2で(A)と抗C D 4 4(B U 7 5)抗体(B)で得られる結合パターンを示している代表的な顕微鏡写真器。H 4 6 0 - 1 6 - 2でより厳しくて広く分散リンパ球の染色が、B U 7 5である。芽中心(緑の矢)は、両方の抗体のためにより弱い染色を有した。拡大は、2 0 0 Xである。

40

図2は、乳癌腫瘍(浸潤性導管癌)に対するH 4 6 0 - 1 6 - 2で結合の代表的な顕微鏡写真器。パネルの黄色とオレンジ矢は、それぞれ悪性細胞の間質細胞とシートを示している。拡大は、1 0 0 Xである。

図3は、ヒト乳癌組織アレイからpage tの疾患乳房組織切片の上でH 4 6 0 - 1 6 - 2で(A)と抗C D 4 4(B U 7 5)抗体(B)で得られる結合パターンを示している代表的な顕微鏡写真器。B U 7 5による悪性細胞対H 4 6 0 - 1 6 - 2によるネガティブ染色の膜状の染色が、ある。拡大は、4 0 0 Xである。

50

図4は、ヒト乳癌組織アレイから乳房組織切片から髄様癌に関してH460-16-2で(A)と抗Her2(c-erbB-2)抗体(B)で得られる結合パターンを示している代表的な顕微鏡写真器。H460-16-2による悪性細胞対抗Her2によるネガティブ染色の強い膜状の染色が、ある。拡大は、200Xである。

図5は、確立したPC-3前立腺癌モデルの腫瘍増殖のH460-16-2、シスプラチン、H460-16-2で+シスプラチンまたはバッファ制御の効果。破線は、抗体が投与された期間を示す。データポイントは、平均の+/-SEMを表す。

図6は、確立したPC-3前立腺癌モデルの体重のH460-16-2、シスプラチン、H460-16-2で+シスプラチンまたはバッファ制御の効果。

図7は、ヒアルロン酸(HA)に対する最低降下高度-MB-231乳癌細胞結合のH460-16-2、BU75(正の制御)またはアイソタイプ対照の効果。 10

図8は、H460-16-2の効果または24の時間の間の最低降下高度-MB-231細胞後処理の細胞周期分布のアイソタイプ対照。

【発明を実施するための最良の形態】

【0050】

実施例1

ハイブリドーマ細胞系H460-16-2を寄託番番号PTA-4621として2002年9月4日の20110-2209米国菌培養収集所(ATCC)(the American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 on November 11, 2003)にブダペスト条約に従って寄託した。 20  
37CFR1.808に従って、沈澱器は寄託資料の市民に有効性に押しつけられる全ての規制が特許を与えると、即座に、取り返しのつかないほど取り出されることを保証する。

【0051】

抗体産生：H460-16-2でモノクローナル抗体は、コレクションと追いまき起こっている二度/週でハイブリドーマをCL-1000フラスコ(BD Biosciences, Oakville, ON)で培養することによって生産された。抗体は、Protein Gセファロース4 Fast Flow(アマシャム Biosciences, Baie d'Urfe, QC)で、標準の抗体精製手順によって精製された。人間であるか、ヒト化またはキメラ化されたか、マウスの抗体であるモノクローナル抗体を利用 30  
することは、この発明の範囲内である。

【0052】

2つのNormal Human Tissue Staining IHC研究がヒト(S.N. 10/603,000)で、そして、L178(S.N. 10/647,818)に対する比較でH460-16-2で抗原分布を特徴づけるために伝導されて以前にあった実施例。以前に生化学方法で測定されるにつれてH460-16-2で抗原がCD44の癌変異体であることができる時から、現在の研究はH460-16-2をCD44(BU75)に向けられるもう一つの抗体と比較する。59の正常な人体組織に対する抗体の結合は、人間の正常な器官組織アレイ(Imagenex、サンディエゴ、癌腫)を使用して実行された。全ての主要な抗体(H460-16-2; BU75抗CD44 40  
(BIOCAN Scientific社、ミシソーガ、ON);そして、マウスIgG負の対照(ダコ、トロント、ON)、5つの $\mu\text{g}/\text{ml}$ (前の最適化ステップの最適濃度であることを分かる)の濃度に、抗体希釈剤緩衝液(ダコ、トロント、ON)で希釈された。負の対照抗体は、製造業者によって全ての哺乳類の組織に負であることが示された。IHCの手続きは、以下の通りである。切片が1時間の間58で乾燥器で乾燥してdeparaffinizedされて、コプリンのそれぞれ4分の間5回をキシレンに浸漬することによってdewaxedした組織は、揺れる。一連の段階的なエタノール洗浄(100%-75%)を通しての処置の後で、切片は水の中で再水和された。スライドはそれからそれぞれ5分の間高さ、培地と低い推力設定で電子レンジで調理されるpH 6  
(ダコ、トロント、オンタリオ)で10mMのクエン酸の緩衝液に没頭して、最終的 50

に冷たいPBSに没頭していた。スライドはそれから6分の間3パーセントの過酸化水素水に没頭していた。そして、それぞれ5分の間3回、PBSで洗われて、乾燥して、室温で5分のUniversal遮断溶液(ダコ、トロント、オンタリオ)でインキュベートされた。H460-16-2、BU75またはアイソタイプ対照抗体(黒色アスペルギルス・グルコースオキシダーゼの方へ、指令するありもしなく哺乳類の組織で誘導性でもない、酵素)は、その働く濃度(各々の抗体のための5つの $\mu\text{g}/\text{mL}$ )に抗体希釈剤緩衝液(ダコ、トロント、オンタリオ)で希釈されて、室温で1時間の間インキュベートされた。スライドをPBSそれぞれ5分の間3回で洗浄した。室温で30分に供給される(ダコEnvisionシステム、トロント、オンタリオ)につれて、主要な抗体の免疫活性は西洋わさびペルオキシダーゼ結合二次抗体で検出して/視覚化した。これがスライドに段をつけることになることをPBSそれぞれ5分と室温で10分の間免疫ペルオキシダーゼ染色のDAB(3,3'-ジアミノベンジジン tetrahydrochloride、ダコ、トロント、オンタリオ)色原体基質解決を加えることによって出現される呈色反応のための3回で洗浄した。スライドを水道水で洗うことは、色素反応を終了した。マイヤーのHematoxylin(シグマDiagnostics、Oakville、ON)による対比染色の後で、滑り面は段階的なエタノール(75-100%)でdehydratedされて、キシレンで掃除された。マウンティング培地(ダコFaramount、トロント、オンタリオ)を使用して、スライドはカバースリップされた。

10

## 【0053】

スライドは、ノーザンプロットのEclipse Imaging Software(ミシソーガ、ON)を使用して、Axiovert 200(ツァイス・カナダ、トロント、ON)とデジタル画像を取得して貯蔵型に扱って、顕微鏡的に検討された。結果は読み込まれて、勝ち取られて、病理学者によって解釈された。表1はH460-16-2とBU75 anti-の結果の概要を示す。そして、CD44が正常な人体組織のアレイの染色される。H460-16-2による組織の染色は、以前に記載され(S.N. 10/603, 000)でそれと類似している。抗原が通常、肝臓、腎臓、心臓と肺を含む不可欠な器官で細胞の上でない点に再び注意されなければならない。H460-16-2で抗体はマクロファージとリンパ球に結合をする。また、それらの存在はこれらの切片で器官の一部で観察される。しかし、BU75抗CD44抗体(図1)で見られるリンパ球の染色の高等強度が、あった。H460-16-2が陽性だった組織は、通常BU75抗CD44(時々より大きな強度に)が陽性でもあった。食道とリンパ節の1つの試料のような2、3の例外があるが、H460-16-2が陰性だった組織は通常、BU75抗CD44が陰性でもあった。これらの結果はそのH460-16-2で結合をBU75抗CD44抗体によって認められる組織のより小さいサブセットに示す、そして、組織の範囲内で、染色の強度は時々より少なくもある。これらの結果は、H460-16-2のための抗原が正常組織(まったく特にヒトの限定された数の組織に対する抗体結合)の上で広く発現されないことを示す。H460-16-2がCD44(すなわちこれらのIHC研究のために使用されるBU75によって認められるものより異なる変異体)のエピトープに向けられるという点で、それも生化学データを支持する。

20

30

## 【0054】

40

【表 1】

Table 1: Comparison of BU75 anti-CD44 and H460-16-2 IHC on Human Normal Tissue

Data Sheet		BU75		H460-16-2	
Sec.No.	Organ	Section Score	Tissue specificity	Section Score	Tissue specificity
1	Skin	+++	Keratinocytes of all layers except Stratum corneum	+++	Keratinocytes of all layers except Stratum corneum
2	Skin	+++	Keratinocytes of all layers except Stratum corneum	+++	Keratinocytes of all layers except Stratum corneum
3	Subcutis fat	-		-	
4	Breast	+	Myoepithelium	+	Myoepithelium
5	Breast	++	Ductular epithelium & Myoepithelium	+	Myoepithelium & Fibroblasts
6	Spleen	+++	Lymphocytes	++	Lymphocytes (more intense in the periafferent area)
7	Spleen	+++	Lymphocytes (more intense in the periafferent area)	+++	Lymphocytes (more intense in the periafferent area)
8	Lymph node	+++	Lymphocytes	+	Lymphocytes
9	Lymph node	+	Lymphocytes	-	
10	Skeletal muscle	+/-	Blood vessels	+/-	Blood vessels
11	Nasal Mucosa	+++	Mucosal epithelium (basal layers)	CD	
12	Lung	++	SMF & Macrophages	++	Lymphocytes & Macrophages
13	Lung	++	Alveolar epithelium & Macrophages	+++	Lymphocytes & Macrophages
14	Bronchus	+++	Chondrocytes	NR	
15	Heart	-		-	
16	Salivary gland	+++	Ductular & acinar epithelium	++	Ductular & acinar epithelium
17	Liver	+++	Kupffer cells	+++	Kupffer cells
18	Liver	+++	Kupffer cells	+++	Kupffer cells
19	Liver	-		-	
20	Gall bladder	+++	Mucosal basal epithelium & Lymphocytes	+	Mucosal basal epithelium & Lymphocytes
21	Pancreas	++	Acinar epithelium	+	Acinar epithelium
22	Pancreas	+++	Acinar epithelium	++	Acinar epithelium
23	Testis	+++	Lymphocytes (less intense at germinal center)	++	Lymphocytes (less intense at germinal center)
24	Esophagus	++	Mucosal basal epithelium layers & Lymphocytes	-	
25	Esophagus	+++	Basal mucosal epithelial layers & Lymphocytes	+++	Basal mucosal epithelial layers
26	Stomach body	+++	Glandular epithelium in the basal glands & Lymphocytes	++	Glandular epithelium in the basal glands & Lymphocytes
27	Stomach body	+++	Glandular epithelium in the basal glands & Lymphocytes	+++	Glandular epithelium in the basal glands & Lymphocytes
28	Stomach antrum	+++	Glandular epithelium in the basal glands & Lymphocytes	++	Glandular epithelium in the basal glands & Lymphocytes
29	Stomach smooth muscle	++	Blood vessels & Peripheral nerve fibers	++	Blood vessels & Fibroblasts
30	Duodenum	+++	Lymphocytes in lamina propria	++	Lymphocytes in lamina propria
31	Small bowel	++	Glandular epithelium & Lymphocytes	+	Lymphocytes in lamina propria
32	Small bowel	+++	Glandular epithelium in the basal glands & Lymphocytes in Lymphoid follicles (Less intense in the germinal center)	+++	Lymphocytes in Lymphoid follicles (Less intense in the germinal center)
33	Appendix	+++	Glandular epithelium in the basal glands & Lymphocytes in Lymphoid follicles (Less intense in the germinal center)	+++	Lymphocytes in lamina propria +/- Glandular epithelium of basal glands
34	Colon	+++	Glandular epithelium in the basal glands & Lymphocytes in Lymphoid follicles (Less intense in the germinal center)	+++	Lymphocytes & peripheral nerve fibers
35	Colon	++	Lymphocytes & endothelium	+++	Lymphocytes in lamina propria
36	Rectum	++	Lymphocytes & Endothelium	+++	Lymphocytes & Fibroblasts
37	Kidney cortex	++	Endothelium of blood vessels	+/-	Interstitial blood vessels
38	Kidney cortex	+/-	Tubular epithelium	+/-	Tubular epithelium
39	Kidney Medulla	++	Endothelium of blood vessels	+/-	SMF & Fibroblasts
40	Urinary Bladder	++	Transitional epithelium & endothelium of blood vessels	++	Lymphocytes & Macrophages +/- Transitional epithelium & endothelium of blood vessels
41	Prostate	+++	Myoepithelium	+++	Myoepithelium
42	Prostate	+++	Myoepithelium	++	Myoepithelium
43	Scrotal Vesicle	+/-	Endothelium & SMF	+/-	Mucosal epithelium, Endothelium & SMF
44	Testis	+/-	Endothelium of blood vessels	+/-	Endothelium of blood vessels & Fibroblasts
45	Endometrium noninflamed	+++	Stroma & endothelium of blood vessels & Adjacent myometrium	++	Stroma & endothelium of blood vessels & Adjacent myometrium
46	Endometrium inflamed	+++	Glandular epithelium, Stroma & Endothelium	++	Glandular epithelium, Stroma & Endothelium
47	Myometrium	+++	SMF	+++	SMF
48	Uterus cervix	+++	Basal layers of mucosal epithelium & Endothelium of blood vessels	+++	Basal layers of mucosal epithelium
49	Salpinx	++	SMF & endothelium of blood vessels	+	SMF & Fibroblasts
50	Ovary	++	Endothelium & SMF of blood vessels	+/-	SMF of blood vessels
51	Placenta villi	+/-	Endothelium of blood vessels	+/-	Endothelium of blood vessels
52	Placenta villi	+/-	Endothelium of blood vessels	+/-	Endothelium of blood vessels
53	Umbilical cord	-		-	
54	Adrenal gland	+/-	Endothelium of blood vessels	+/-	Endocrine glands
55	Thyroid	+/-	Endothelium of blood vessels	+/-	Parafollicular cells & Endothelium of blood vessels
56	Thymus	++	Lymphocytes	+/-	Lymphocytes
57	Brain white matter	-		-	
58	Brain gray matter	-		-	
59	Carotid duct	-		-	

Abbreviations: SMF: Smooth muscle fibers, NR: The section is not representative.

【0055】

実施例 3

ヒト乳癌腫瘍染色

【0056】

以前の IHC 研究がヒト乳癌に対して行われ、H460-16-2 で抗原の癌共同を決定することを引き受ける。また、H460-16-2 で抗体がヒト癌 (S.N. 10/603, 000) と方法を認めるために可能性があったかどうかに関係なく、それは L178 (S.N. 10/647, 818) で抗 CD44 染色に比較した。現在では、比較は BU75 抗 CD44 染色 (黒色アスペルギルス・グルコースオキシダーゼに向けられる c-erbB-2 抗 Her2 と抗体) のために、哺乳類の組織 (負の対照) で誘導性どちらのある nor- でもない酵素とされた。乳癌組織アレイは 50 人の乳癌患者に由来した、そして、乳癌患者で非腫瘍性の乳房組織に由来する 10 の試料が使われた (Imgen

10

20

30

40

50

e x 社、サンディエゴ、癌腫)。以下の情報は、各々の患者に提供された：年齢 (C a n c e r ( A J C C ) 腫瘍の病期、リンパ節、エストロゲン受容体 ( E R ) とプロゲステロン受容体 ( P R ) 状態に関する性的、アメリカの J o i n t 委員会)。実施例 5 からの I H C の手続きは、従われた。全ての抗体が、1 . 5 の  $\mu\text{g} / \text{mL}$  の濃度で使われた抗 H e r 2 を除いて、5 つの  $\mu\text{g} / \text{mL}$  の働く濃度で使われた。表 2 と 3 は、それぞれ H 4 6 0 - 1 6 - 2 の概要と乳癌組織アレイの B U 7 5 抗 C D 4 4 抗体染色を提供する。各々のアレイは、5 0 人の個体患者から腫瘍試料を含んだ。全体として、試験される 5 0 人の患者の 6 2 パーセントは、B U 7 5 a n t i - C D 4 4 のために 7 3 パーセントと比較して H 4 6 0 - 1 6 - 2 で抗原が陽性だった。H 4 6 0 - 1 6 - 2 と B U 7 5 抗 C D 4 4 が同じ組織を染色したケースにおいて、試料の 4 5 パーセントは、H 4 6 0 - 1 6 - 2 まで割に B U 7 5 抗 C D 4 4 で染色している高等強度を有した。H 4 6 0 - 1 6 - 2 と B U 7 5 抗原のために、それぞれ、乳癌患者からの 1 0 の正常な乳房組織試料からの 4 と 8 は、陽性だった。エストロゲンとプロゲステロン受容体状態間のはっきりした相互関係は、明白でなかった。それも、H 4 6 0 - 1 6 - 2 のより大きな陽性発現と高等腫瘍の病期による C D 4 4 抗原に向かう傾向であると思われなかった。

【 0 0 5 7 】

【表 2】

Table 2: Human Breast Tumor IHC Summary for H460-16-2

		Total #	Binding Score					Total Positive	% Positive
			-	+/-	+	++	+++		
Patient Samples	Tumor	50	19	19	4	3	5	31	62
	Normal	10	0	1	0	2	1	4	40
ER Status	ER+	28	13	13	1	1	0	15	54
	ER-	22	6	8	3	0	5	16	73
	Unknown	0	0	0	0	0	0	0	0
PR Status	PR+	19	9	8	1	1	0	10	53
	PR-	30	8	14	3	0	5	22	73
	Unknown	1	0	1	0	0	0	1	100
AJCCTumorStage	T1	4	2	1	1	0	0	2	50
	T2	21	6	9	1	1	4	15	71
	T3	20	9	9	1	0	1	11	55
	T4	5	2	2	1	0	0	3	60

【 0 0 5 8 】

【表 3】

Table 3: Human Breast Tumor IHC Summary for Anti-CD44 (BU75)

		Total #	Binding Score					Total Positive	% Positive
			-	+/-	+	++	+++		
Patient Samples	Tumor	48	13	6	13	7	9	35	73
	Normal	10	2	0	3	2	3	8	80
ER Status	ER+	27	8	4	10	2	3	19	70
	ER-	21	5	2	3	5	6	16	76
	Unknown	0	0	0	0	0	0	0	0
PR Status	PR+	18	4	2	8	2	2	14	78
	PR-	29	8	4	5	5	7	21	72
	Unknown	1	1	0	0	0	0	0	0
AJCC Tumor Stage	T1	4	1	2	0	1	0	3	75
	T2	20	7	0	6	2	5	13	65
	T3	19	5	2	5	3	4	14	74
	T4	5	0	2	2	1	0	5	100

【 0 0 5 9 】

支質細胞が明らかに悪性細胞がネガティブであり、シードであった図 2 で、非常に陽性のことを証明した。H 4 6 0 - 1 6 - 2 で抗原で見られる細胞局在パターンは、m a j o r i t y o f ケースで細胞膜に限定された。B U 7 5 C D 4 4 抗体はより多くの乳癌試

料を染色して、H460-16-2(表4)と比較した細胞質の限局化より高い膜の程度を示した。BU75抗CD44もページェット病の悪性細胞にしみをつけた。そして、それはH460-16-2(図3)のために本当でなかった。H460-16-2で染色が陽性だった正常組織由来乳癌患者の試料は、BU75抗CD44染色に対してもポジティブでもあった。c-erbB-2に対する比較において、H460-16-2は、H460-16-2で抗原のために陽性であるとする31の乳房腫瘍組織標本からの16が会ったことのないが乳癌患者(5を表に記入しなさい、図4)の治療的な必要を標的にしたことを示しているHer2発現が陰性だった完全に差染色しているプロフィールを示した。染色の強度の違いが、H460-16-2とHer2が陽性だった乳房腫瘍組織切片の間にもあった; H460-16-2で抗原が非常に陽性だった若干の乳房腫瘍組織切片は、H460-16-2が乳癌患者の異なる一団を治療的標的にすることを再び示しているHer2とその逆が少し陽性であるだけだった。c-erbB-2抗体も、明らかに正常な乳房組織切片のうちの1つを染色した。これらの結果は、H460-16-2のための抗原が乳癌患者のほぼ3分の2によって発現されることができると示唆する。加えて、H460-16-2で処置のために適当なそれらの大多数は、抗Her2処置のために適当でなかった。染色パターンは患者試料で、抗体が悪性細胞のために非常に特異的であることを示した、そして、H460-16-2で抗原はそれによってそれに魅力的なdrugableな標的を作っている細胞膜に局所化される。類似的である。H460-16-2のより限られた染色対BU75抗CD44抗体が再びH460-16-2でエピトープの可能性を示す、CD44のより制限された変異体である。

10

20

【0060】

【表 4】

Table 4: Comparison of BU75 anti-CD44 and H460-16-2 IHC on Human Tumor and Normal Breast

Data sheet				BU75		H460-16-2	
Seq. No.	Sex	Age	Diagnosis	Section Score	Tissue specificity	Section Score	Tissue specificity
1	F	28	Infiltrating duct carcinoma	++	Tumor cells & Stroma	+/-	Tumor cells
2	F	71	Solid papillary carcinoma	+	Tumor cells & Stroma	+	Tumor cells
3	F	26	Infiltrating duct carcinoma	+/-	Tumor cells & Stroma	-	
4	F	43	Infiltrating duct carcinoma	+	Tumor cells	-	
5	F	39	Infiltrating duct carcinoma	+++	Tumor cells	+	Tumor cells & Necrotic area
6	F	46	Ductal carcinoma in situ	-		+	
7	F	47	Infiltrating duct carcinoma	+++	Tumor cells	+++	Tumor cells
8	M	67	Infiltrating duct carcinoma	+	Tumor cells & Stroma	-	
9	F	33	Infiltrating duct carcinoma	+++	Tumor cells	-	Tumor cells & Stroma
10	F	47	Infiltrating duct carcinoma	+	Tumor cells & Stroma	+	Tumor cells & Stroma
11	F	49	Invasive lobular carcinoma	-		-	
12	F	46	Infiltrating duct carcinoma	+	Tumor cells & Stroma	+/-	Tumor cells & Stroma
13	F	39	Infiltrating duct carcinoma	-		+/-	
14	F	43	Infiltrating lobular carcinoma	+	Tumor cells	+	Tumor cells
15	F	54	Infiltrating lobular carcinoma	+++	Tumor cells	+/-	Tumor cells
16	F	58	Infiltrating duct carcinoma	++	Tumor cells & Stroma	++	Tumor cells
17	F	37	Infiltrating duct carcinoma	-	Tumor's cells +/- Stroma	-	Tumor cells +/- Stroma
18	F	43	Infiltrating duct carcinoma	+++	Tumor cells	+	Tumor cells
19	F	51	Infiltrating duct carcinoma	+++	Tumor cells	++	+++ Stroma
20	F	80	Mucillary carcinoma	+++	Tumor cells & Lymphocytes	+++	Tumor cells
21	F	36	Infiltrating duct carcinoma	NR		+++	Tumor cells
22	F	59	Infiltrating duct carcinoma	+	Tumor cells	+/-	Tumor cells ++ Stroma
23	F	34	Ductal carcinoma in situ	+	Tumor cells	+/-	Tumor cells & Necrotic area
24	F	54	Infiltrating duct carcinoma	-	Tumor cells & Stroma	+/-	Tumor cells
25	F	47	Infiltrating duct carcinoma	++	Tumor cells	+	Tumor cells
26	F	53	Infiltrating duct carcinoma	+	Tumor cells & Lymphocytes	+/-	Tumor cells ++ Stroma
27	F	69	Infiltrating duct carcinoma	+	Tumor cells ++ Stroma	+/-	Tumor cells +++ Lymphocytes
28	F	60	Signet ring cell carcinoma	F		-	
29	F	37	Infiltrating duct carcinoma	+/-	Tumor cells & Stroma	+/-	Tumor cells
30	F	46	Infiltrating duct carcinoma	-	Tumor cells + Stroma	+/-	Tumor cells & Stroma
31	F	35	Infiltrating duct carcinoma	-		-	
32	F	47	Infiltrating duct carcinoma	++	Tumor cells	-	+/- Necrotic area
33	F	54	Infiltrating duct carcinoma	+	Tumor cells	-	
34	F	47	Infiltrating duct carcinoma	+++	Tumor cells	+++	Tumor cells
35	F	41	Infiltrating duct carcinoma	-		-	
36	F	38	Infiltrating duct carcinoma	++	Tumor cells	+	Tumor cells
37	F	55	Infiltrating duct carcinoma	-	Tumor cells ++ Stroma	-	
38	F	65	Infiltrating duct carcinoma	-	Tumor cells ++ Stroma	-	Tumor cells +/- Stroma
39	M	69	Infiltrating duct carcinoma	-	Tumor cells & Necrotic area	-	
40	F	44	Infiltrating duct carcinoma	+/-	Tumor cells & Stroma	-	Tumor cells + Infiltrating Lymphocytes
41	F	52	Metastatic carcinoma in Lymph node	++	Tumor cells & Stroma	+/-	Tumor cells & Stroma
42	F	52	Metastatic carcinoma in Lymph node	+	Tumor cells	-	
43	F	58	Metastatic carcinoma in Lymph node	++	Tumor cells	++	Tumor cells
44	F	52	Metastatic carcinoma in Lymph node	-		-	
45	F	58	Metastatic carcinoma in Lymph node	-	Tumor cells +++ Lymphocytes	+/-	Tumor cells & Lymphocytes
46	F	38	Metastatic carcinoma in Lymph node	+/-	Tumor cells & Lymphocytes	-	Tumor cells + Lymphocytes
47	F	45	Metastatic carcinoma in Lymph node	++	Tumor cells	+	Tumor cells
48	F	45	Metastatic carcinoma in Lymph node	+	Tumor cells	+/-	Tumor cells
49	F	29	Metastatic carcinoma in Lymph node	+++	Tumor cells	+++	Tumor cells
50	F	61	Metastatic carcinoma in Lymph node	+/-	Tumor cells +++ Lymphocytes	+/-	Tumor cells ++ Lymphocytes
51	F	46	Nipple	+++	Keratinocytes (all layers except Stratum corneum)	++	Keratinocytes (all layers except Stratum corneum)
52	F	47	Nipple	+	Tumor cells	-	
53	F	40	Normal Breast	++	Ductular epithelium	-	
54	F	43	Normal Breast	+++	Ductular epithelium & Myoepithelium	+++	Myoepithelium
55	F	40	Normal Breast	++	Ductular epithelium & Myoepithelium	++	Myoepithelium
56	F	40	Normal Breast	+++	Myoepithelium +/- Ductular epithelium	+/-	Myoepithelium & Fibroblasts
57	F	45	Normal Breast	-		-	
58	F	44	Normal Breast	-		-	
59	F	37	Normal Breast	+	Ductular basement membrane +/- Ductular epithelium	-	
60	F	51	Normal Breast	+	Myoepithelium & Endothelium	- (FD)	

Tissue

【 0 0 6 1 】

10

20

30

40

【表 5】

Table 5: Comparison of c-erbB-2 anti-Her2 and H460-16-2 IHC on Human Tumor and Normal

Data sheet			c-erbB-2		H460-16-2		
Sec. No.	Sex	Age	Diagnosis	Section Score	Tissue specificity	Section Score	Tissue specificity
1	F	28	Infiltrating duct carcinoma	+	Tumor cells	+/-	Tumor cells
2	F	71	Solid papillary carcinoma	-	-	+	Tumor cells
3	F	28	Infiltrating duct carcinoma	+/-	Tumor cells	-	-
4	F	43	Infiltrating duct carcinoma	+/-	Tumor cells	-	-
5	F	39	Infiltrating duct carcinoma	NR	-	+	Tumor & Necrotic area
6	F	46	Ductal carcinoma in situ	-	-	-	-
7	F	47	Infiltrating duct carcinoma	+++	Tumor cells	+++	Tumor cells
8	M	67	Infiltrating duct carcinoma	-	-	-	-
9	F	33	Infiltrating duct carcinoma	+++	Tumor cells	-	Tumor cells ++ Stroma
10	F	47	Infiltrating duct carcinoma	++	Tumor cells	+	Tumor cells & Stroma
11	F	49	Invasive Lobular carcinoma	PD	-	-	-
12	F	48	Infiltrating duct carcinoma	-	-	+/-	Tumor cells & Stroma
13	F	39	Infiltrating duct carcinoma	+++	Tumor cells	-	-
14	F	43	Infiltrating lobular carcinoma	-	-	+	Tumor cells
15	F	54	Infiltrating lobular carcinoma	-	-	+/-	Tumor cells
16	F	58	Infiltrating duct carcinoma	-	-	+	Tumor cells ++ Necrotic area
17	F	37	Infiltrating duct carcinoma	+++	Tumor cells	-	Tumor cells +/- Stroma
18	F	43	Infiltrating duct carcinoma	-	-	+	Tumor cells +++ Stroma
19	F	51	Infiltrating duct carcinoma	+	Tumor cells	++	Tumor cells
20	F	80	Medullary carcinoma	-	-	+++	Tumor cells
21	F	36	Infiltrating duct carcinoma	NR	-	+++	Tumor cells & Stroma
22	F	59	Infiltrating duct carcinoma	-	-	+/-	Tumor cells
23	F	34	Ductal carcinoma in situ	+++	Tumor cells	+/-	Tumor cells & Necrotic area
24	F	54	Infiltrating duct carcinoma	+	Tumor cells	+/-	Tumor cells
25	F	47	Infiltrating duct carcinoma	-	-	+	Tumor cells
26	F	53	Infiltrating duct carcinoma	+++	Tumor cells	+/-	Tumor cells ++ Stroma
27	F	59	Infiltrating duct carcinoma	+	Tumor cells	+/-	Tumor cells +++ Lymphocytes
28	F	80	Signet ring cell carcinoma	-	-	-	-
29	F	37	Infiltrating duct carcinoma	+++	Tumor cells	+/-	Tumor cells
30	F	46	Infiltrating duct carcinoma	-	-	+/-	Tumor cells & Stroma
31	F	35	Infiltrating duct carcinoma	-	-	-	-
32	F	47	Infiltrating duct carcinoma	+++	Tumor cells	-	Tumor cells +/- Necrotic area
33	F	54	Infiltrating duct carcinoma	-	-	-	-
34	F	47	Infiltrating duct carcinoma	+++	Tumor cells	+++	Tumor cells
35	F	41	Infiltrating duct carcinoma	-	-	-	-
36	F	38	Infiltrating duct carcinoma	++	Tumor cells	+	Tumor cells
37	F	55	Infiltrating duct carcinoma	+/-	Tumor cells	-	-
38	F	65	Infiltrating duct carcinoma	-	-	-	Tumor cells
39	M	66	Infiltrating duct carcinoma	-	-	-	+/- Stroma
40	F	44	Infiltrating duct carcinoma	-	-	-	Tumor cells + Infiltrating Lymphocytes
41	F	52	Metastatic carcinoma in Lymph node	-	-	+/-	Tumor cells & Stroma
42	F	32	Metastatic carcinoma in Lymph node	-	-	-	-
43	F	58	Metastatic carcinoma in Lymph node	++	Tumor cells	+	Tumor cells
44	F	52	Metastatic carcinoma in Lymph node	+++	Tumor cells	-	-
45	F	58	Metastatic carcinoma in Lymph node	-	-	+/-	Tumor cells & Lymphocytes
46	F	38	Metastatic carcinoma in Lymph node	++	Tumor cells	-	Tumor cells + Lymphocytes
47	F	45	Metastatic carcinoma in Lymph node	-	-	+	Tumor cells
48	F	46	Metastatic carcinoma in Lymph node	-	-	+/-	Tumor cells
49	F	29	Metastatic carcinoma in Lymph node	-	-	+++	Tumor cells
50	F	61	Metastatic carcinoma in Lymph node	-	-	+/-	Tumor cells ++ Lymphocytes
51	F	46	Nipple	-	-	++	Keratinocytes (all layers except Stratum corneum)
52	F	47	Nipple	+++	Tumor cells	-	-
53	F	40	Normal Breast	-	-	-	-
54	F	43	Normal Breast	-	-	+++	Myoepithelium
55	F	40	Normal Breast	+/-	Ductular epithelium	++	Myoepithelium
56	F	40	Normal Breast	-	-	+/-	Myoepithelium & Fibroblasts
57	F	45	Normal Breast	-	-	-	-
58	F	44	Normal Breast	-	-	-	-
59	F	37	Normal Breast	-	-	-	-
60	F	51	Normal Breast	-	-	-(PD)	-

Breast Tissue

乳房組織

【0062】

実施例 4

生体内 PC - 3 確立化学療法組み合わせ腫瘍実験

10

20

30

40

50

図5および図6を参照すると、8週間目の雄の重篤複合免疫不全マウスに対する6、6、襟首で皮下に注射される100マイクロリットルの生理食塩水で、100万のPC-3ヒト前立腺癌細胞で入れられた。腫瘍増殖は、毎週、カリパス副木で測定された。大部分のコホートが21日ポスト移植で80の $\text{mm}^3$  (範囲50 - 130  $\text{mm}^3$ )の腫瘍容積に達したとき、8匹のマウスはランダムに4つの投与群の各々への隷下であった。H460-16-2で抗体、化学療法薬シスプラチン、H460-16-2とシスプラチンの組合せまたはバッファ制御は、2.7mMのKCl、1mMの $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、137mMの塩化ナトリウムと20mMの $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ を含んだ希釈剤で、標準的な濃度から希釈の後、300マイクロリットル量で、それぞれ15または6mg/kgの抗体またはシスプラチンで腹腔内投与された。H460-16-2またはバッファ制御は、それから、移植後日41まで同じ様式で全体で11の投与量のために1週につき3回が続く第1の週の間、1週につき4回投与された。シスプラチンは、抗体治療期間の日0、5、10と15に投与された。腫瘍増殖は移植後日48までカリパス副木で第7の日ごと頃に測定された、または、個体までは、動物はCCAC終点に着いた。動物の体重は、本研究の期間の間原建築費だった。本研究終了後、全ての動物は、CCACガイドラインに従って安楽死させられた。ペアードt-検定を使用して、処置と関係している後処理全身腫瘍組織量減少(図5)が、いずれのシスプラチンもまたはH460-16-2とシスプラチンの組合せであった。日48(7日後処理)で2つの処置がバッファ制御( $p=0.0001$ )、シスプラチン処置( $p=0.004$ )単独またはH460-16-2で処置( $p=0.0001$ )単独より治療期間の直後に腫瘍増殖を抑制してよりかなり効果的だったシスプラチンとH460-16-2。PC-3は前立腺癌の悪液質モデルである。そこにおいて、異種移植モデルの増加した全身腫瘍組織量と疾患進行には減量が付いてくる。図6で示される平均重量によって示されるにつれて、全ての群のマウスは重篤な減量を経験した。この研究において、全ての群のマウスは、治療期間末までには約23~35パーセントの減量を示した。H460-16-2による治療群は、減量(21.7パーセント)で最も少ない程度を示した。処置の末端の直後に、H460-16-2+シスプラチン処置と関係している体重の追加重要な損失が、割にバッファ制御( $p=0.5042$ )になかった。したがって、H460-16-2+シスプラチンは、ヒト乳癌疾患のよく認識されたモデルで、割にバッファ制御まで全身腫瘍組織量を降ろした。これらの結果は、人を含む哺乳類で、癌治療のためにこの抗体の薬理学で製薬利点を示唆する。

10

20

30

【0063】

#### 実施例5

##### ヒアルロン酸(HA)結合アッセイ

最低降下高度-MB-231の細胞(以前、FACS分析によってH460-16-2で抗原(CD44)を発現することが示される)がそうであった実施例5は組織培養皿から使いきった培地を吸引した後に分離した。そして、細胞が分離するまで、PBSでプレートを洗って、5mLの解離緩衝液を各々のプレートに加えて、37でプレートをインキュベートした。細胞は、それから計数されて、50mLの管(s)に集められた。細胞は5分の間1200rpmで回転して、100万~500万のcells/mLを産生するために、培地で再懸濁された。1mLは、それから2mLのディーブウェルの各々のウェルに加えられた。細胞は5分の間1200rpmでプレートを回転させることによって小球をぶつけられた、そして、過剰な上澄みはペーパータオル上へプレートを逆にすることによって除去された。ディーブウェル・プレートは、それから、細胞ペレットを除去して、分解するために、穏やかにボルテックスされた。1mLのH460-16-2、BU75(正の制御、BIOCAN Scientific社、ミシソーガ、ON)またはアイソタイプ負の対照(107.3、BD Biosciences、Oakville、ON)抗体は、各々のウェルに加えられて、それから穏やかなvortexingによって混合された。プレートは、それから2時間37でインキュベートされた。一方、48-ウェル・プレートは、37で1-2時間の間4mgの/nil HA原液/ウェルの300の $\mu\text{l}$ をインキュベートすることによって、HAでおおわれていた。インキュベ

40

50

シヨンの後、過剰なHAは離れて吸引された、そして、プレート(s)は層流で完全にフードを空気乾燥させておかれた。抗体-細胞インキュベーションが完了状態であったあと、細胞はSupernatantがペーパータオルの上でディープウェルを逆にして除去された5分の間1200rpmで再び小球をぶつけられた。各々のウェルに、塩化マグネシウムと塩化カルシウムを含んでいるPBSで、ディープウェルは2つの $\mu\text{M}$  calcitonin-amの1.2mLの追加が続く細胞ペレットを解離させるために、再びボルテックスされた。細胞は再懸濁された、そして、250 $\mu\text{l}$ /ウェルはHAおおわれているプレートに転写された。HA被覆プレートは、それから、癒着を許すために、2時間の間37でインキュベートされた。インキュベーションの後、独立の細胞は、吸引を通して取り出された。各々のウェルは、それから、いかなる独立の細胞でもまたは細胞集団を除去するために塩化マグネシウムと塩化カルシウムを含んでいるPBSで、2-3回洗われた。プレートはパーキン-エルマーHTS7000蛍光プレート読本で読まれた、そして、データはMicrosoft Excelで分析された、そして、結果は表6または図7で表化された。平均6つの別々の実験からの結果は、H460-16-2の平均1.87の(+/-1.01) $\mu\text{g}/\text{mL}$ がHA(表6)に最低降下高度-MB-231細胞の結合の50パーセントの減少を引き起こすために必要なことを明らかにした。HAに対する最低降下高度-MB-231細胞結合のH460-16-2の効果は、従属する投与量であった; H460-16-2の20の $\mu\text{g}/\text{mL}$ は、HA(図7)に、細胞結合の60パーセントの減少についてののに帰着した。これらの結果は、少なくとも一つには、H460-16-2がHAに結合の原因となって、従って電子逆探装置を通して新脈管形成または腫瘍侵襲性のダウンレギュレーションを通してその抗癌効果を説明していることができたCD44の上で領域(s)で相互作用することを示した。

10

20

【0064】

【表6】

Table 6: Summary of Effect of H460-16-2 on MDA-MB-231 Cell Binding to HA

Experiment	Concentration of Antibody to Yield 50 Percent Adhesion ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
1	2.42
2	0.99
3	2.56
4	0.70
5	1.87
6	1.06
Average	1.87
Standard Deviation	1.01

30

40

【0065】

実施例6

細胞周期アッセイ

MDA-MB-231の細胞周期に対するH460-16-2の効果、FACS分析を使用することを評価した。H460-16-2で抗体(0、0.2、2.0、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )またはアイソタイプ対照(クローン107.3、BD Biosciences、Oakville、ON)は、24、48と72時間、最低降下高度-MB-231乳癌細胞でインキュベートされた。治療を受けて未処置の細胞はヨウ化プロピジウムでだけ

50

された、そして、単細胞は相対的なDNA含有量を評価するためにフローサイトメトリによって分析された。低二倍体染色を示している細胞と同様に単細胞母集団のゲーティングによって、取得したデータ・セットは、BD CellQuestを使用して分析された。この分析の後、24時間の間16-2でH460-で処置される細胞は、下位Gi母集団の投与量従属する増加と同様に循環細胞のパーセンテージの全体の減少を示した。下位Gi母集団の中に現れた細胞は、細胞膜完全性の損失による失われたDNAを有して、プログラム死細胞集団(図8)を表すことができる細胞である。このデータは、H460-16-2が細胞循環とこの効果がプログラム死細胞の数の投与量従属する増加にもたらした最低降下高度-MB-231に影響を及ぼすことを証明した。図中証拠の優越性は、HAに対するCD44のH460-16-2が炭水化物従属する立体配置的エピトープの連結反応を通しての効果がCD44の変異体の上で提示する。また、このエピトープが結合に少なくとも部分的に関係している抗癌を調節することである。このエピトープに対するH460-16-2の結合が対応する細胞の上でアポトーシスに導くことができるという証拠も、ある。S.N. 10/713, 451で、抗体が同族の抗原を最低降下高度-MB-231細胞のような細胞を発現することから免疫沈降させるのに用いられることができることをH460-16-2に明らかにされた。それに対して、実例を示されるが、FACS、細胞ELISAまたはIHCに限定されていない技術を利用して、さらに、H460-16-2で抗体がCD44抗原性部位を発現する細胞および/または組織の検出で使われることができることを示されることができた。どの特に結合このように、免疫沈降されたH460-16-2で抗原がそのようなFACS、細胞ELISAまたはIHCアッセイを使用しているそのような細胞または組織にH460-16-2の結合を阻害することができることを示されることができた。さらに、H460-16-2で抗体と同様に、他の抗CD44抗体は他の型のCD44抗原を免疫沈降して、単離するのに用いられることができた、そして、抗原はアッセイの同一形式を使用している抗原を発現する細胞または組織に対するそれらの抗体の結合を阻害するのに用いられることもできる。CD44(すなわち汎CD44抗体)の全ての形状を認める抗CD44抗体がその同族の抗原を単離するのに用いられる場合、その抗原がその抗原を発現する細胞または組織にH460-16-2で抗原の結合を阻害することもできることを示されることができた。そして、このようにまた、その抗原を発現している細胞および組織の上でH460-16-2の結合をCD44のエピトープに示した。あるいは、H460-16-2の比較と競合結合測定のようなアッセイの汎CD44抗体。ELISA、細胞ELISA、FACSまたはその種の他のもの両方の抗体があるところその抗原を発現している細胞および組織のCD44のエピトープに対するH460-16-2の結合を示すこともできる。

#### 【0066】

この明細書で言及される全ての特許と刊行物は、本発明が関係する当業者のレベルで表示。あたかも個々の刊行が参照によって組み込まれることを特に、そして、個々に示されるかのように、全ての特許と刊行物は同じ範囲への言及によって本明細書中に組み込まれる。本発明のある種の形状が例示される間、それが本明細書中に記載される部品の特異的な形状または配置に限られていることになっていなくて、示されることになっていないと理解されることになっている。種々の変化が本発明の範囲から逸脱することなくなされることができることは当業者にとって明らかである。また、本発明は示されて、明細書で記載されることに限られて考慮されることになっていない。当業者は、本発明が物体を実行して、言及される末端と利点を得るのに適しているウェル(その中で固有のそれらと同様に)であると容易に認める。本明細書中に記載されるいかなるオリゴヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、生物学的に関連した化合物、方法、手順と技術は、現在好ましい実施形態を代表して、典型的なことを目的として、範囲に対する制限を、意図しない。その中の変化と他の用途が、本発明の精神の範囲内で含まれて、添付された特許請求の範囲の範囲によって定義される当業者の心に浮かぶ。本発明が特異的な好ましい実施形態と関連して記載された、それは理解されなければならないその本発明請求する。そのような特異的な実施形態に過度に制限しなければならない。実際、当業者にとって明らかである搬出

本発明のための描かれたモードの種々の修飾は、以下の請求の範囲内のことを目的とする。

【図面の簡単な説明】

【0067】

【図1】正常な人体組織アレイから扁桃の組織切片の上でH460-16-2で(A)と抗CD44(BU75)抗体(B)で得られる結合パターンを示している代表的な顕微鏡写真器。H460-16-2でより厳しくて広く分散リンパ球の染色が、BU75である。芽中心(緑の矢)は、両方の抗体のためにより弱い染色を有した。拡大は、200Xである。

【図2】乳癌腫瘍(浸潤性導管癌)に対するH460-16-2で結合の代表的な顕微鏡写真器。パネルの黄色とオレンジ矢は、それぞれ悪性細胞の間質細胞とシートを示している。拡大は、100Xである。

10

【図3】ヒト乳癌組織アレイからpage tの疾患乳房組織切片の上でH460-16-2で(A)と抗CD44(BU75)抗体(B)で得られる結合パターンを示している代表的な顕微鏡写真器。BU75による悪性細胞対H460-16-2によるネガティブ染色の膜状の染色が、ある。拡大は、400Xである。

【図4】ヒト乳癌組織アレイから乳房組織切片から髄様癌に関してH460-16-2で(A)と抗Her2(c-erbB-2)抗体(B)で得られる結合パターンを示している代表的な顕微鏡写真器。H460-16-2による悪性細胞対抗Her2によるネガティブ染色の強い膜状の染色が、ある。拡大は、200Xである。

20

【図5】確立したPC-3前立腺癌モデルの腫瘍増殖のH460-16-2、シスプラチン、H460-16-2で+シスプラチンまたはバッファ制御の効果。破線は、抗体が投与された期間を示す。データポイントは、平均の+/-SEMを表す。

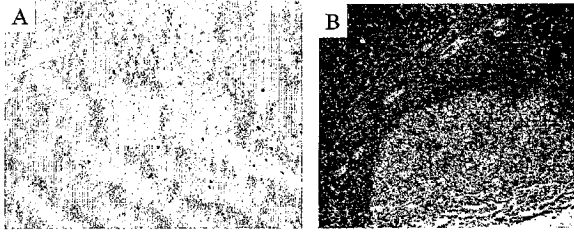
【図6】確立したPC-3前立腺癌モデルの体重のH460-16-2、シスプラチン、H460-16-2で+シスプラチンまたはバッファ制御の効果。

【図7】ヒアルロン酸(HA)に対する最低降下高度-MB-231乳癌細胞結合のH460-16-2、BU75(正の制御)またはアイソタイプ対照の効果。

【図8】H460-16-2の効果または24の時間の間の最低降下高度-MB-231細胞後処理の細胞周期分布のアイソタイプ対照。

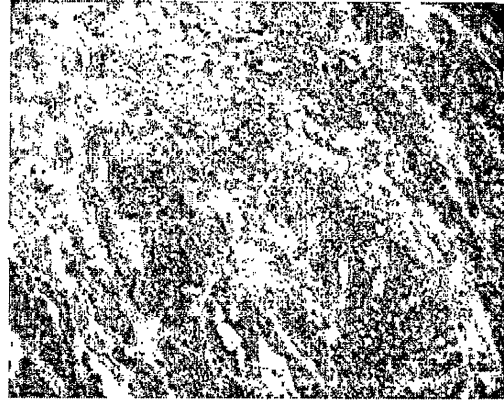
【 図 1 】

Figure 1



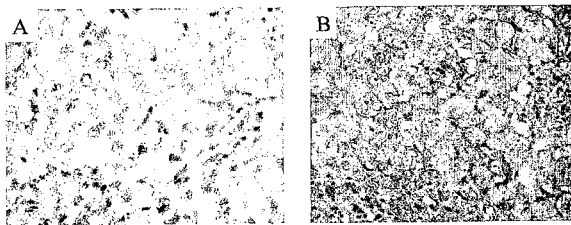
【 図 2 】

Figure 2



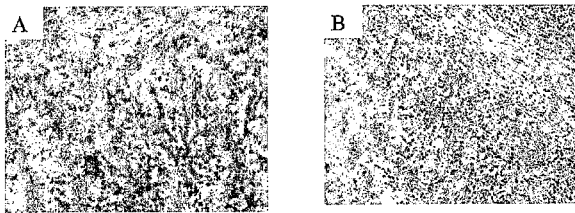
【 図 3 】

Figure 3



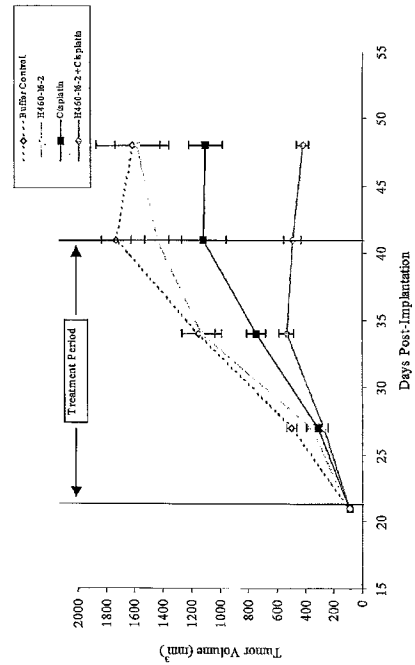
【 図 4 】

Figure 4



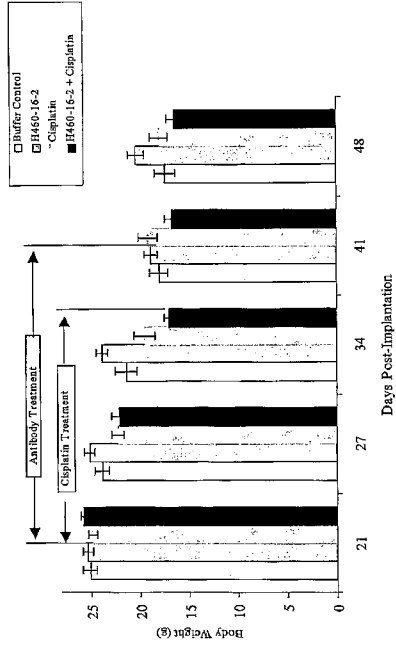
【 図 5 】

Figure 5



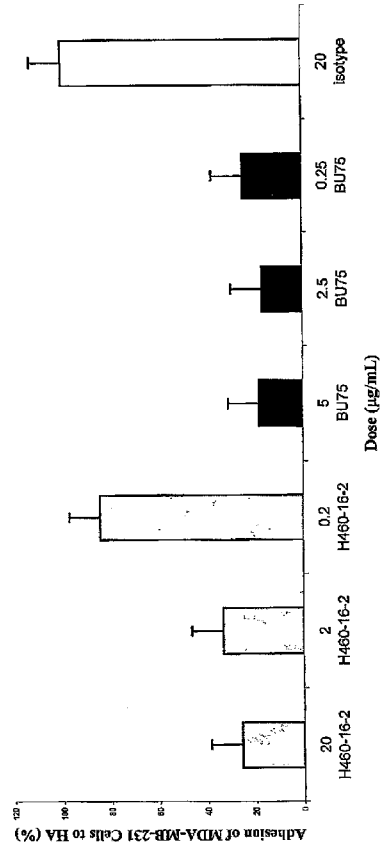
【 6 】

Figure 6



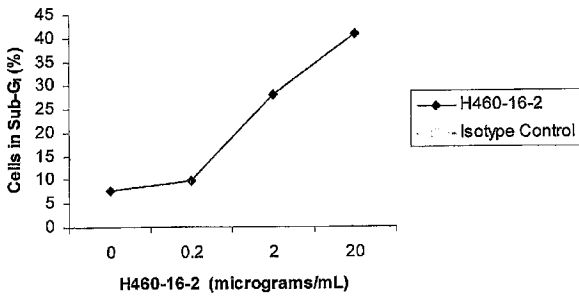
【 7 】

Figure 7



【 8 】

Figure 8



## 【誤訳訂正書】

【提出日】平成19年4月16日(2007.4.16)

## 【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

癌疾患を患っている患者を処置する方法であって、

前記患者に対して、癌疾患の処置に有用である抗癌抗体の生産方法に基づいて生産され、癌組織の細胞に対する細胞障害性を示すとともに非癌細胞に対しては本来障害性を持たないという性質を持つ抗癌抗体またはそのフラグメントを投与することを含み、

前記抗体またはそのフラグメントが、医薬的に許容されるアジュバントとの混合状態に置かれて、前記癌疾患の処置を調節するのに有効な量で投与され、

前記抗体が、前記癌組織によって発現される抗原性部位に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントであり、前記抗原性部位が、PTA-4621としてATCCに寄託されたクローンによってコードされるモノクローナル抗体の同定された特徴を持つ抗体によって結合しているという性質を持つ、癌疾患を患っている患者を処置する方法。

## 【請求項2】

前記抗体またはそのフラグメントがヒト化またはキメラ化されている、請求項1記載の癌疾患を患っている患者を処置する方法。

## 【請求項3】

請求項1記載の癌疾患を患っている患者を処置する方法であって、前記抗体またはその抗原結合フラグメントを毒素、酵素、放射性化合物、および血液原細胞からなる選択される構成要素と生存率を高める、および/または疾患進行を遅らせる方法することで抗体複合体を形成すること、ならびに

前記患者に前記抗体複合体またはその複合化フラグメントを投与することを含み、

前記抗体複合体またはその複合化フラグメントが、医薬的に許容されるアジュバントとの混合状態に置かれるとともに、前記癌疾患の処置を調節するのに有効な量で投与される、請求項1記載の癌疾患を患っている患者を処置する方法。

## 【請求項4】

前記抗体またはそのフラグメントがヒト化またはキメラ化している、請求項1記載の癌疾患を患っている患者を処置する方法。

## 【請求項5】

前記抗体またはそのフラグメントの細胞障害性が抗体依存型細胞障害性を介して調節される請求項1記載の癌疾患を患っている患者を処置する方法。

## 【請求項6】

前記抗体またはそのフラグメントの細胞障害性が補体依存型細胞障害性を介して調節される請求項1記載の癌疾患を患っている患者を処置する方法。

## 【請求項7】

前記抗体またはそのフラグメントの細胞障害性が細胞化学結合の加水分解を触媒することを介して調節される請求項1記載の癌疾患を患っている患者を処置する方法。

## 【請求項8】

前記抗体またはそのフラグメントの細胞障害性が、腫瘍細胞に存在する推定癌抗原に対して免疫反応を生産することを介して調節される請求項1記載の癌疾患を患っている患者を処置する方法。

## 【請求項9】

前記抗体またはそのフラグメントの細胞障害性が、それらの機能に干渉する細胞膜タンパ

ク質を標的化することを介して調節される請求項 1 記載の癌疾患を患っている患者を処置する方法。

【請求項 10】

前記抗体またはそのフラグメントの細胞障害性は、細胞殺害を開始させるシグナルの生成に有効な細胞タンパク質で構造的変化を生じさせることを介して調節される請求項 1 記載の癌疾患を患っている患者を処置する方法。

【請求項 11】

前記生産方法が、特定の個体から得られる癌および非癌細胞を含む組織試料を利用する請求項 1 記載の癌疾患を患っている患者を処置する方法。

【請求項 12】

癌疾患を患っている患者を処置する方法であって、

前記患者に対して、癌疾患の処置に有用である抗癌抗体の生産方法に基づいて生産され、癌組織の細胞に対する細胞障害性を示すとともに非癌細胞に対しては本来障害性を持たないという性質を持つ抗癌抗体またはそのフラグメントを投与することを含み、

前記抗体が、PTA-4621としてATCCに寄託されたクローンによって単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントであり、医薬的に許容されるアジュバントとの混合状態に置かれるとともに、前記癌疾患の処置を調節するのに有効な量で投与される癌疾患を患っている患者を処置する方法。

【請求項 13】

前記抗体またはそのフラグメントがヒト化またはキメラ化されている請求項 12 記載の癌疾患を患っている患者を処置する方法。

【請求項 14】

前記抗体またはそのフラグメントを、毒素、酵素、放射性化合物、および血液原細胞からなる群から選択される構成要素と生存率を高める、および/または疾患進行を遅らせる方法することで抗体複合体を形成すること、ならびに

前記抗体複合体またはその複合化フラグメントを前記患者に投与することを含み、

前記複合化された抗体が、医薬的に許容されるアジュバントとの混合状態に置かれるとともに、前記癌疾患の処置を調節するのに有効な量で投与される請求項 12 記載の癌疾患を患っている患者を処置する方法。

【請求項 15】

前記抗体またはそのフラグメントがヒト化またはキメラ化されているサブセットから選択される請求項 12 記載の癌疾患を患っている患者を処置する方法。

【請求項 16】

前記抗体またはそのフラグメントの細胞障害性が抗体依存型細胞障害性を介して調節される請求項 12 記載の癌疾患を患っている患者を処置する方法。

【請求項 17】

前記抗体またはそのフラグメントの細胞障害性が補体依存型細胞障害性を介して調節される請求項 12 記載の癌疾患を患っている患者を処置する方法。

【請求項 18】

前記抗体またはそのフラグメントの細胞障害性が細胞化学結合の加水分解を触媒することを介して調節される請求項 12 記載の癌疾患を患っている患者を処置する方法。

【請求項 19】

前記抗体またはそのフラグメントの細胞障害性が、腫瘍細胞に存在する推定癌抗原に対して免疫反応を生産することを介して調節される請求項 12 記載の癌疾患を患っている患者を処置する方法。

【請求項 20】

前記抗体またはそのフラグメントの細胞障害性が、それらの機能に干渉する細胞膜タンパク質を標的化することを介して調節される請求項 12 記載の癌疾患を患っている患者を処置する方法。

【請求項 21】

前記抗体またはそのフラグメントの細胞障害性は、細胞殺害を開始させるシグナルの生成に有効な細胞タンパク質で構造的変化を生じさせることを介して調節される請求項 1 2 記載の癌疾患を患っている患者を処置する方法。

【請求項 2 2】

前記生産方法が、特定の個体から得られる癌および非癌細胞を含む組織試料を利用する請求項 1 2 記載の癌疾患を患っている患者を処置する方法。

【請求項 2 3】

細胞表面の上で C D 4 4 抗原性部位を発現するヒト腫瘍細胞の細胞障害性を調節する方法であって、

前記腫瘍細胞を、前記発現された C D 4 4 抗原性部位に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントであって前記抗原部位が P T A - 4 6 2 1 として A T C C に寄託されたクローンによってコードされるモノクローナル抗体の同定された特徴を持つ抗体に結合することで特徴づけられる単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントと、接触させることを含み、

細胞障害性が前記結合の結果として生ずる、細胞表面上の C D 4 4 抗原性部位を発現するヒト腫瘍細胞の細胞障害性を調節するプロセス。

【請求項 2 4】

前記抗体またはそのフラグメントがヒト化またはキメラ化している請求項 2 3 記載のプロセス。

【請求項 2 5】

前記単離された抗体またはその抗原結合フラグメントを毒素、酵素、放射性化合物、および血液原細胞からなる選択される構成要素と生存率を高める、および/または疾患進行を遅らせる方法することで抗体複合体を形成する請求項 2 3 記載のプロセス。

【請求項 2 6】

前記単離された抗体またはその抗原結合フラグメントがヒト化またはキメラ化されている請求項 2 3 記載のプロセス。

【請求項 2 7】

前記単離された抗体またはその抗原結合フラグメントがマウスである請求項 2 3 記載のプロセス。

【請求項 2 8】

ヒト腫瘍組織試料が大腸、卵巣、肺、前立腺、および乳房組織からなる群から選択される組織に発生する腫瘍から得られる請求項 2 3 記載のプロセス。

【請求項 2 9】

P T A - 4 6 2 1 として A T C C に寄託されたクローンによってコードされる単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントに対して特異的に結合する C D 4 4 抗原性部位を発現する細胞の存在を測定する結合アッセイであって、

細胞試料を提供すること、

前記発現された C D 4 4 抗原性部位に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントであり、前記抗原部位が P T A - 4 6 2 1 として A T C C に寄託されたクローンによってコードされるモノクローナル抗体の同定された特徴を持つ抗体に結合することで特徴づけられる、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを提供すること、

前記単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを前記細胞試料と接触させること、

前記単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントと前記試料との結合を測定すること、を含み、

前記単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントに特異的に結合する C D 4 4 抗原部位を発現する細胞の存在を測定する結合アッセイ。

【請求項 3 0】

前記細胞試料が大腸、卵巣、肺、前立腺、および乳房組織からなる群から選択される組織

に発生する腫瘍から得られる請求項 29 記載のプロセス。

【請求項 31】

単離されたモノクローナル抗体またはその抗原フラグメントに対して特異的に結合し、P T A - 4 6 2 1 として A T C C に寄託されたクローンによってコードされるモノクローナル抗体の同定された特徴を持つ抗体に結合することで特徴づけられる C D 4 4 抗原部位を発現する試料に含まれる細胞を単離またはスクリーニングするプロセスであって、

細胞試料を提供すること、

前記発現された C D 4 4 抗原性部位に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントであり、前記抗原部位が P T A - 4 6 2 1 として A T C C に寄託されたクローンによってコードされるモノクローナル抗体の同定された特徴を持つ抗体に結合することで特徴づけられる、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを提供すること、

前記単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを前記細胞試料と接触させること、

前記単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントと前記試料との結合を測定すること、を含み、

P T A - 4 6 2 1 として A T C C に寄託されたクローンによってコードされる単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントに対して特異的に結合する C D 4 4 抗原部位を発現する前記細胞が、前記結合によって単離され、前記細胞試料での該細胞の存在が確認される、細胞を単離またはスクリーニングの方法。

【請求項 32】

前記細胞試料が大腸、卵巣、肺、前立腺、および乳房組織からなる群から選択される組織に発生する腫瘍から得られる請求項 31 記載のプロセス。

【請求項 33】

寄託番号 P T A - 4 6 2 1 として A T C C に寄託されたクローンによってコードされるモノクローナル抗体の同定された特徴を持つモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントに対して特異的に結合する抗原を発現するほ乳類のヒト腫瘍を処置することで、生存率を高めるとともに / または疾患進行を遅らせる方法であって、

前記ほ乳類の腫瘍の全身腫瘍組織量を減少させるのに有効な量の前記モノクローナル抗体を前記ほ乳類に投与することを含み、それによって疾患の進行が遅くなり、および / または生存率が高くなる、生存率を高めるとともに / または疾患進行を遅らせる方法。

【請求項 34】

前記抗体が細胞障害性部位と複合化する請求項 33 記載の方法。

【請求項 35】

前記細胞障害性部位が放射性同位元素である請求項 33 記載の方法。

【請求項 36】

前記抗体が補体を活性化させる請求項 33 記載の方法。

【請求項 37】

前記抗体が抗体依存型細胞障害作用を調節する請求項 33 記載の方法。

【請求項 38】

前記抗体がマウスの抗体である請求項 33 記載の方法。

【請求項 39】

前記抗体がヒト化抗体である請求項 33 記載の方法。

【請求項 40】

前記抗体がキメラ化抗体である請求項 33 記載の方法。

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【書類名】 明細書

【発明の名称】 CD44表面発現を示している細胞の細胞障害性調節

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌疾患の診断および処置、詳しくは腫瘍細胞の細胞障害性の調節 (mediation)、および最も詳しくは細胞障害性反応を引き起こすための手段としての癌疾患修飾抗体 (CDMAB) の使用 (一種類以上の化学療法剤と任意に併用させた状態で) に関する。本発明はさらに、本発明のCDMABを利用する結合アッセイに関する。

【背景技術】

【0002】

ヒト白血球に対するモノクローナル抗体の産生は、CD44抗原の発見をもたらした。このCD44抗原は、単鎖のヒアルロン酸 (HA) 結合糖タンパク質であり、広範囲に及ぶ正常組織および全ての種類の造血細胞上で発現する。CD44抗原は、当初、リンパ球活性化およびリンパ球ホーミングに結びつけて考えられていた。現在、一般に考えられているその生理学的役割として、炎症性遺伝子の活性化、細胞周期の変調、細胞増殖の誘導、分化および発現の誘導、細胞骨格再構成および細胞移動の誘導、ならびにアポトーシスに対する細胞生存/耐性も挙げられる。

【0003】

ヒトでは、CD44の単一遺伝子コピーが第11染色体の短腕 (11p13) 上に位置している。この遺伝子は、19個のエクソンを含み、最初の5個が定常、次の9個が可変、その後の3個が定常、さらに最後の2個が可変である。選択的スプライシングによって、1,000を上回る異なったイソホームを得ることができる。しかし、現在のところ、同定された天然の変異体は数十にすぎない。

【0004】

CD44標準糖タンパク質は、N末端細胞外 (20アミノ酸長のリーダー配列および膜近位領域 (85アミノ酸長) を含む) 領域 (270アミノ酸長)、膜貫通領域 (21アミノ酸長)、ならびに細胞質尾部 (72アミノ酸長) からなる。細胞外領域は、N末端に連結モジュールも有する。この領域は、92アミノ酸長であり、多くのHA結合連結タンパク質に対して相同性を示す。ヒトCD44の形態とマウスCD44の形態とのあいだに高い相同性がある。そのタンパク質の可変型をエクソン5のカルボキシル基末端に挿入すると発現の際に細胞外に位置する。

【0005】

CD44の血清可溶性も天然に生じ、終止コドン (可変領域内) またはタンパク質分解活性のいずれかに起因し得る。TNF- $\alpha$  を含む種々の刺激による細胞の活性化によって、腫瘍細胞によるCD44受容体の遊離放出が生ずる。この受容体の遊離放出は、腫瘍細胞によっても見られ、それによってCD44の血清濃度が最高10倍まで増加する。CD44の血清濃度が高いことは、悪性 (例外として卵巣癌) であることを示唆している。

【0006】

CD44の標準形態は、分子量約37kDを有するものとして存在する。翻訳後の修飾は、分子量を80~90kDに増加させる。このような修飾として、アスパラギン残基でのアミノ末端細胞外領域N結合グリコシル化、細胞外領域のカルボキシ末端でのセリン/スレオニン残基のO-結合グリコシル化、およびグリコサミノグリカン付加が挙げられる。スプライス変異体の大きさは、80~250kDの範囲内にある。

【0007】

ほ乳類動物の細胞外マトリックス (ECM) に位置する多糖類であるHAは、主要なCD44リガンドとして考えられる。しかし、コラーゲン、フィブロネクチン、およびラミニン等のタンパク質にCD44が結合するという知見も得られている。不活性CD44 (HAに結合せず) のグリコシル化の度合いは最も高く、活性CD44 (HAに結合) の場合は最も低く、誘導性CD44 (サイトカイン、モノクローナル抗体、増殖因子等によって活性化されない限り、HAに結合しないか、結合しても弱い) のグリコシル化の度合い

は、活性型と不活性型とのおおよそ中間にある。

【0008】

CD44は、細胞の相互作用、刺激、および環境に左右される複数のシグナル伝達経路を介して、その機能の一部を調節することができる。これらの伝達経路の一部として、NF- $\kappa$ Bシグナル伝達カスケード（炎症反応に関連）、Ras-MARKシグナル伝達経路（細胞周期および増殖の活性化に関連）、タンパク質のRhoファミリー（細胞骨格再構築および細胞移動に関連）、ならびにPI3-K関連シグナル伝達経路（細胞生存に関連）が挙げられる。上記機能の全てが主要疾患開始および進行と密接に関連している。CD44も種々の付加的な機構によって癌の原因に関係があるとされている。これらの機構として、悪性疾患に関係する受容体に対するCD44の細胞表面上に存在する細胞表面プロテオグリカンによる増殖因子、ケモカイン、およびサイトカインの提示が挙げられる。また、CD44-HA複合体の内在化後にリソソーム・ヒアウロニダーゼによるHAの細胞内分解によって、ECMを介した新脈管形成の誘導と腫瘍侵襲性の可能性とが潜在的に増加し得る。さらに、生存またはアポトーシスのシグナルの伝達は、標準的または可変的CD44受容体を介して生ずることが示されている。CD44は、細胞分化および移動に関係することも示唆された。全てではないにしても、これらの機構の多くが環境および細胞に依存しており、さらにいくつかは結果にばらつきが生じた。したがって、何らかの結論が出される前に、より多くの研究をおこなうことが求められている。

【0009】

癌でのCD44の潜在的な機能的役割を確認するために、CD44の発現を検討して、その受容体が疾患進行と相関するかどうかを判断した。しかし、大部分の種類の腫瘍で得られた知見は矛盾するものであり、このことは研究者間で試薬の組み合わせ、手法、病理学的採点法、および細胞種が異なることによると考えられる。腎細胞癌および非ホジキン（Hodgkin）リンパ腫は、例外であると思われる。高CD44発現腫瘍を有する患者の生存期間は、その対照となる低または非CD44発現腫瘍を有する患者の生存期間よりも一貫して短かった。

【0010】

癌との関連性により、抗癌療法の開発がCD44を標的としておこなわれてきた。CD44の標準型または変異型が腫瘍進行に必要なかどうかについての論争が依然としておこなわれている。両方の観点を指示する生体内（in vivo）動物データがあり、また一方では腫瘍型に依存し、さらには細胞型にも依存すると考えられる。異なる治療的アプローチとして、可溶性CD44タンパク質、ヒアルロンン・シンターゼcDNA、およびヒアルロンニダーゼの注射と、CD44アンチセンスおよびCD44特異抗体の使用とが含まれていた。各々のアプローチは、ある程度の成功をもたらしたことから、抗CD44癌療法に対するサポートが得られた。

【0011】

変異体CD44特異的モノクローナル抗体および標準CD44特異的モノクローナル抗体の産生は、実験的におこなわれてきた。しかし、ほとんどの場合、これらの抗体は固有の生物活性を持たず、むしろ該抗体が認識するCD44のタイプに対して特異的に結合する。しかし、一部のものは、生体外（in vitro）または生体内（in vivo）のいずれかで活性を示す（しかし一般に両方で活性を示すことはない）。いくつかの抗CD44抗体が、細胞で生ずる現象を調節することが示された。例えば、ヒト赤血球ルセラン抗原CD44標準型に対するマウス抗体A3D8は、CD（9-1抗体）およびCD（OKT3抗体）調節T細胞活性化を高めることが示され、別の抗CD44抗体は類似の効果を生じた。A3D8は、単球からのIL-1放出およびTリンパ球からのIL-2放出もおこなう。興味深いことに、ダウノルピシン、ミトキサントロン、およびエトポシド等の薬剤と併用してA3D8の使用は、第二メッセンジャーであるセラミドの生成を抑制することによって、HL60およびNB4AML細胞でのアポトーシス誘導を阻害した。固有の活性を持たずCD44の同様なエピトープに対するJ173抗体は、薬剤誘導アポトーシスを阻害しなかった。85~110kDおよび200kD形のCD44に対するNIH44-1抗

体は、CD44の交叉結合または凝集であると著者が推測する経路を介して、T細胞増殖を増強させた。ひとまとめにして考えると、このような抗体が癌に対するもの（例えば、リンパ球の活性化）ではなく、細胞増殖を誘導するものでもなく、あるいは細胞障害性薬とともに使用した際に癌細胞の薬物誘導死をもたらすこともないことから、これらが癌治療を目的とした用途に適しているという証拠はない。

#### 【0012】

いくつかの抗CD44抗体が生体内（in vivo）で抗腫瘍効果を示すということが記載された。抗体1.1ASML（CD44の変異体に対するマウスIgG1）によってラット膀胱腺癌BSp73ASMLのリンパ節および肺転移が減少することが示されている。処置した動物の生存は、同時に増加した。この抗体は、リンパ節コロニー形成前に投与される場合のみに効果的であり、リンパ節での細胞増殖を妨げた。生体外（in vitro）での腫瘍細胞に対する抗体の直接的な細胞障害性は見られず、この抗体によって補体媒体細胞障害性または免疫エフェクター細胞機能が高められることはなかった。ヒト細胞に対する抗体の有用性については、記載されていない。

#### 【0013】

ブレイヤー（Breyer）他は、同所移植されたラット膠芽腫の進行を中断させるために、CD44に対する市販の抗体を用いることを記載した。ラット膠芽腫細胞株C6を前頭葉に移植し、1週間後、ラットに対して、脳内注射による抗体処置を3回おこなった。処置されたラットでは、腫瘍の増殖減少が示され、また緩衝液またはイソタイプ対照処置ラットよりも高体重であった。抗体は、細胞外マトリックス成分によって被覆されたカバーガラスに対する生体外（in vitro）細胞接着を阻害することが可能であった。しかし、細胞に対する直接的な細胞障害性効果を有しなかった。この抗体の試験は、ヒト細胞に対してはおこなわれなかった。

#### 【0014】

CD44（IM-7.8.1）に対する抗体の有効性をCD44v10（K926）に対する抗体と比較する研究がおこなわれた。高転移性マウス黒色腫B16F10株（両方のCD44イソタイプを発現）がマウスに静脈内移植された。2日後から、3日毎に抗体の投与が本研究継続中なされた。両抗体ともに、肺転移の数を、50%を上回るほど著しく減少させ、2つの抗体間で有効性に有意な差はみられなかった。抗体は、生体外（in vitro）での増殖に影響を及ぼさず、著者であるザバズキ（Zabadzki）他は腫瘍増殖阻害がCD44とそのリガンドとの相互作用を抗体が阻害することによるものと推測した。IM-7.8.1を用いた別の研究では、ザバズキ（Zabadzki）他は、抗体およびそのF(ab')<sub>2</sub>フラグメントがマウスT細胞リンパ腫LBによってリンパ節浸潤を阻害することが可能であることを証明した。これは、マウスに対して顕著な延命効果を与えた。ヴァラッハ-ダヤン（Wallach-Dayan）他は、腫瘍を自発的に形成しなLB-TRマウスのリンパ種がCD44v4-10によるトランスフェクションによって腫瘍形成能を与えられたことを示した。IM-7.8.1投与によって、イソタイプ対照抗体と比べて、移植トランスフェクト細胞の腫瘍サイズが減少した。これらの研究のいずれも、この抗体に関するヒトでの有用性については示されなかった。

#### 【0015】

GKW.A3（マウスIgG2a）は、ヒトCD44に対して特異的であり、SCIDマウスでのヒト黒色腫異種移植の形成および転移を妨げる。この抗体を転移性ヒト細胞株SMMU-2と混合して皮下注射した。処置は、その後3週間にわたって続けられた。4週間後、未処置の動物では100パーセントであるのに比べて、10匹のマウスのうち1匹のみが注射部位で腫瘍を発生させた。抗体のF(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、腫瘍形成を同様に阻害することを示したことから、その作用機序が補体または抗体依存性細胞障害に依存しないことが示唆された。初回抗体注射の1週間前に腫瘍細胞を注射した場合、80パーセントの動物で原発部位に腫瘍が生じた。しかし、留意すべき点は、生存期間が依然として著しく高いということであった。抗体遅延投与が原発腫瘍形成に対して何ら効果を示さなかったことにかかわらず、未処置の動物では存在した肺、腎臓、副腎、肝臓、お

よび腹膜への転移を完全に防いだ。この抗体は、生体外 (in vitro) で上記細胞株に対して直接的な細胞障害性をまったく示さないか、あるいは S M M U - 2 細胞の増殖を妨げ、さらに転移または増殖に影響を及ぼすことで腫瘍形成に対して大きな効果を有すると思われる。この抗体の1つの顕著な特徴は、それが C D 4 4 の全てのイソタイプを認識したということであり、このことは治療を目的とした使用の可能性に限界があることを示唆した。

#### 【 0 0 1 6 】

シュトロベール (Strobel) 他は、マウス異種移植モデルでヒト卵巣癌細胞の腹膜移植を阻害するために抗 C D 4 4 抗体 (クローン 5 1 5) を用いることを記述している。ヒト卵巣の細胞株 3 6 M 2 を、抗 C D 4 4 抗体または対照抗体の存在下で、マウスへ腹腔内移植し、その後の 2 0 日間にわたって処置薬を投与した。5 週間後に、抗体処置群の腹膜腔で小結節の数が著しく少なかった。抗 C D 4 4 処置群および対照処置群に由来する小結節の大きさは、同じであり、このことは細胞がひとたび移植されると、抗体は腫瘍増殖に対して何ら効果を示さなかったことを示唆した。細胞を皮下移植した場合も腫瘍増殖に対する効果はなく、抗体それ自体が抗増殖または細胞障害性効果を持たないことを示した。また、生体外 (in vitro) での細胞増殖に対する抗体の効果はみられなかった。

#### 【 0 0 1 7 】

V F F - 1 8 ( B I W A 1 ともいう) は、ポリペプチドの 3 6 0 ~ 3 7 0 領域に対して特異的である C D 4 4 の v 6 変異体に対する高親和性抗体である。この抗体は、1 2 人の患者の第 1 相臨床試験で<sup>9 9 m</sup> テクネチウム標識複合体として用いられている。この抗体を、頭部および頸部に扁平上皮癌を持つ患者での標的化可能性と安全性とについて、試験した。注射後の 4 0 時間、注射投与量の 1 4 パーセントが腫瘍に取り込まれ、その際、腎臓、脾臓、および骨髄を含む他の器官での蓄積は最小であった。高度に選択的な腫瘍結合は、この抗体の放射免疫療法での役割を示唆している一方で、この抗体の非常に高い親和性が腫瘍のより深い層への浸透を妨げている。B I W A 1 の適用をさらに制限するものは、マウス抗体の免疫原性 (患者 1 2 人中 1 1 人にヒト抗マウス抗体 (H A M A) が生じた)、腫瘍全体に及ぶ異質性の蓄積、および抗体可溶性 C D 4 4 複合体の形成である。W O 0 2 / 0 9 4 8 7 9 は、H A M A 応答を克服するために設計された V F F - 1 8 のヒト化バージョン (B I W A 4 と命名) を開示している。B I W A 4 の抗原結合親和性が親 V F F 1 8 抗体よりも著しく低いという知見が得られた。驚くべきことに、低親和性 B I W A 4 抗体は、高親和性 B I W A 8 ヒト化 V F F - 8 抗体よりも優れた腫瘍取り込み特性を有した。患者 3 3 人に対する第 1 相臨床試験をおこなうことで、<sup>9 9 m</sup> テクネチウム標識および<sup>1 8 6</sup> レニウム標識 B I W A 4 抗体の安全性、耐容性、腫瘍蓄積、および最大許容投与量 (<sup>1 8 6</sup> R e 標識 B I W A 4 の場合) を評価した。<sup>1 8 6</sup> R e 標識 B I W A 4 の全ての用量で腫瘍反応がみられなかったにみられなかった。しかし、いくつかのものは安定病態を有し、用量規定障害性が 6 0 m C i / m<sup>2</sup> で生じた。有害事象率は 5 0 ~ 6 5 パーセントであり、患者 3 3 人中 1 2 人が深刻な有害事象 (血小板減少症、白血球減少症、および発熱) を有すると思われ、またそのうちの 6 人 (全員が<sup>1 8 6</sup> R e 標識 B I W A 4 による処置を受けた) が処置または経過観察の過程で疾患進行により死亡した。<sup>1 8 6</sup> R e 標識 B I W A 4 の用量を段階的に増量する第 1 相試験を患者 2 0 人に対して実施した。口腔粘膜炎および用量規定血小板減少症および白血球減少症が観察され、1 人の患者では H A H A 反応が出現した。安定病態は、6 0 m C i / m<sup>2</sup> という最も高い用量で処置された患者 5 人にみられた。達成される有効性について安全性および耐容性の両方の面から許容可能であると考えられるにもかかわらず、これらの研究は、臨床試験で他の非放射性同位元素併用生物学的療法に比べて、有害事象率が高い。米国特許出願第 2 0 0 3 / 0 1 0 3 9 8 5 号は、腫瘍治療を目的として、メイタシオイドを結合させた V F F - 1 8 のヒト化バージョン (B I W A 4 と命名) を開示している。ヒト化 V F F 1 8 抗体 (B I W A 4) は、毒素 (すなわち、B I W I 1) を結合した場合に、外陰部ヒト扁平上皮細胞癌、咽頭有棘細胞癌、または乳癌のマウス・モデルで顕著な抗腫瘍効果を示すという知見が得られた。非結合型バージョンである B I W A 4 は抗腫瘍効果を示さず、また結合型バージョンで

あるB I W I 1はヒトでの安全性および有効性に関する証拠を何ら示していない。

【0018】

M a b U 3 6は、U M - S C C - 2 2 Bヒト下咽頭癌細胞免疫化ならびに癌および組織特異性に対する選択性によって得られたマウス・モノクローナルI g G 1抗体である。c D N Aクローニングおよび配列分析を通しての抗原特徴付けは、ケラチノサイト特異的C D 4 4スプライス変異体エピカンのv 6領域をM a b U 3 6の標的として特定した。免疫組織化学的検査では、このエピトープが細胞膜に限定されていることが示された。さらに、M a b U 3 6は、頭頸部扁平上皮癌(H N S C C)の94%を強く標識し、またこの腫瘍内で均一な細胞染色がみられた。患者10人の<sup>99m</sup>Tc標識M a b U 3 6を検査したところ、H N S C C癌に対する抗体の選択的蓄積(2日間で20.4 ± 12.4パーセント注入量/kg)がみられ、副作用は報告されていないが、患者2人にH A M Aが発症した。放射性ヨウ素標識マウスM a b U 3 6の検査では、患者18人中、H A M Aの症例が3件あり、選択的かつ一様なH N S C Cへの取り込みがみられた。M a b U 3 6の抗原性を低下させるとともにH A M Aの率を低下させるために、キメラ抗体が作られた。キメラおよび本来のマウスM a b U 3 6は、いずれもA D D C活性を示さなかった。M a b U 3 6が持つ本来の機能活性に関する証拠はみられない。186Re標識キメラM a b U 3 6を用いて、治療薬としてのM a b U 3 6の有用性について判断した。この第1相試験では、投薬量増量治験患者13人に対して、探索量の<sup>99m</sup>Tc標識キメラM a b U 3 6が与えられ、続いて<sup>186</sup>Re標識キメラM a b U 3 6が投与された。急性有害事象の報告はなかったが、後処置投与量を制限する骨髄障害性(1.5GBq/m<sup>2</sup>)が患者3人のうち2人にみられ、また最大許容投与量(1.0GBq/m<sup>2</sup>)による処置を受けた1人の患者に血小板減少症が認められた。腫瘍サイズに対して多少の効果があったにもかかわらず、これらの効果は処置に対する他感的応答基準を満たすものではなかった。<sup>186</sup>Re標識キメラM a b U 3 6に関するさらなる研究は、顆粒球コロニー刺激因子刺激全血返血という戦略を利用して最大耐容活性を2.8Gyに倍化させた。頭頸部に種々の腫瘍を持つ患者9人に対するこの研究で、3人が薬物関連貧血症のために輸血を必要とした。他の障害性として、重度(グレード3)の骨髄障害性および中等度(グレード2)の粘膜炎が挙げられる。安定病態が5人の患者で3~5ヵ月間達成されたにもかかわらず、客観的腫瘍反応は既報告でなかった。したがって、わかることは、M a b U 3 6が非常に特異的な抗体であるにもかかわらず、抗癌効果を達成するために放射性免疫複合体を必要とすることが障害になって、その有益性が制限されることであり、その理由として、達成される臨床効果に関連して治療に伴う障害性がある。

【0019】

要約すると、C D 4 4 v 6 ( 1 . 1 A S M L ) およびC D 4 4 v 1 0 ( K 9 2 6 ) モノクローナル抗体は、それぞれ、転移性膵臓腺癌を注射されたラットまたは悪性黒色腫を注射されたマウスの転移活性を減少することが示されている。別の抗C D 4 4 v 6抗体(V F F - 1 8とその誘導体)は、メイタンシノイドまたは放射性同位元素に結合される場合のみに、抗腫瘍効果を有することが示された。抗標準C D 4 4モノクローナル抗体は、ラット・グリア芽細胞腫(抗C D 4 4)による大脳内進行、マウスT細胞リンパ腫によるリンパ節浸潤(I M - 7 . 8 . 1)を抑制すること、同様にヌードマウス(クローン515)でのヒト卵巣癌細胞株の移植、マウス・メラノーマ細胞株の肺転移(I M - 7 . 8 . 1)、およびS C I Dマウス(G K W . A 3)でのヒト・メラノーマ細胞株の転移を阻害することが明らかになった。放射性同位元素結合M a b U 3 6抗C D 4 4 v 6抗体およびその誘導体は、臨床試験で、顕著な障害性を伴う抗腫瘍活性を有した。これらの結果は、彼らを励ますとともに可能性のある癌療法としての抗C D 4 4モノクローナル抗体の開発を支持したにもかかわらず、ヒト癌に対する有効性、安全性、および適用性に限界があることを示している。

したがって、癌細胞障害性を調節する抗体組成物が単離されるならば、癌細胞上のC D 4 4の細胞表面発現に対するその親和性の効用として、有益な診断および治療方法が実現されるだろう。

## 【 0 0 2 0 】

## 先行特許

特許文献 1 は、患者腫瘍由来の細胞に M H C 遺伝子を形質移入するプロセスを開示しており、この M H C 遺伝子はその患者の細胞または組織からクローニングすることが可能である。

特許文献 2 は、ほ乳類の腫瘍性および正常細胞の細胞内構成要素に対して特異的であり、細胞外構成要素に対しては非特異的であるモノクローナル抗体を得る工程と、そのモノクローナル抗体を標識する工程と、標識された抗体と腫瘍性の細胞を殺すための治療を受けたほ乳類の組織とを接触させる工程と、変性腫瘍細胞の細胞内構成要素に対する標識抗体の結合を測定することによって治療の効果を決定する工程とを含むプロセスを開示している。ヒト細胞内抗原に特異的な抗体を調製する際に、特許権者は悪性細胞がそのような抗原の簡便な供給源であることを認めている。

特許文献 3 は、新規な抗体とその生産方法とを提供する。詳しくは、この特許は、ヒト腫瘍（例えば、大腸および肺の腫瘍）に関連したタンパク質抗原と強固に結合し、その一方で正常細胞への結合の度合いがかなり低いという性質を持つモノクローナル抗体の形成を教示している。

## 【 0 0 2 1 】

特許文献 4 は、癌治療のための方法を提供するもので、この方法は、ヒト癌患者から腫瘍組織を外科的に除去すること、腫瘍組織を処理することで腫瘍細胞を得ること、腫瘍細胞に放射線を照射することで、生存可能ではあるが非腫瘍形成性にする、ならびにこれらの細胞を用いて、原発性腫瘍の再発を妨げると同時に転移を阻止することが可能な患者用アクチンを調製することを含む癌治療の方法を提供する。この特許は、モノクローナル抗体の開発を教示しており、このモノクローナル抗体は腫瘍の表面抗原に対して反応する。第 4 段落 4 5 行目（以下参照）に記載されているように、特許権者は、ヒト腫瘍形成で有効かつ特異的な免疫治療を示すモノクローナル抗体の開発で自所性の腫瘍細胞を利用する。

特許文献 5 は、ヒト上皮性悪性腫瘍に特有であり、かつそれが由来する上皮組織に依存しない糖タンパク質抗原を教示している。

特許文献 6 は、H e r 2 発現細胞でアポトーシスを誘導する抗 H e r 2 抗体、該抗体を産生するハイブリドーマ細胞株、上記抗体を用いて癌を処置する方法、および上記抗体を含む医薬組成物に関する。

特許文献 7 は、精製されたムチン抗原に対するモノクローナル抗体を生産するための新規ハイブリドーマ細胞株を記載している。

特許文献 8 は、所望の抗原に特異的な抗体を産生するヒトリンパ球を生産する方法、モノクローナル抗体を生産する方法、およびこの方法によって生産されるモノクローナル抗体に関する。この特許は、特に癌の診断および処置に有用な抗 H D ヒト・モノクローナル抗体の生産に関する。

## 【 0 0 2 2 】

特許文献 9 は、抗体、抗体フラグメント、抗体複合体、およびヒト上皮性悪性腫瘍細胞と反応する単鎖免疫毒素に関する。これらの抗体作用が 2 倍になるメカニズムは、ヒト癌の表面に存在する細胞膜抗原と反応する点で、また抗体は癌細胞内に内在化する能力を持つという点であり、結合の後で、抗体薬物複合体および抗体毒素複合体の形成に特に有用となる。未修飾形態では、抗体もまた、特定の濃度で細胞障害性を発現する。

特許文献 10 は、腫瘍の治療および予防に自己抗体を使用することを開示している。しかし、この抗体は、老いたほ乳類の抗核抗体である。この場合、自己抗体は、免疫系で見いだされる自然抗体の一種であると考えられる。なぜなら、自己抗体は「老いたほ乳類」に由来し、自己抗体が実際に、処置している患者に由来することを必要とはしない。また、この特許は老いたほ乳類に由来する天然またはモノクローナル抗核自己抗体とモノクローナル抗核自己抗体を産生するハイブリドーマ細胞株とを開示している。

特許文献 11 は、C D 4 4 遺伝子の変異体エクソン v 6 に対する特異的抗体 ( V F F -

18) とその変異体とを開示している。この抗体は、ラットCD44v6変異体よりもむしろヒトCD44v6変異体を認識するという点で、コンパレーター抗体をしのぐ改善である。さらに、この抗体は、CD44v6発現のための診断アッセイを開示する。この抗体に関して、生体外 (in vitro) または生体内 (in vivo) での作用はみられなかった。

特許文献12は、CD44遺伝子のヒト・エクソン6Aによりコードされる配列を含む合成ペプチドに対して産生されたモノクローナル抗体Ver3.1を開示している。詳しくは、この抗体はヒトCD44の90kD形に結合せず、ヘルメス (Hermes) - 3抗体と区別される。CD44のv6変異体を検出する方法を提供するとともに、この抗原に基づく悪性転換をスクリーニングして評価するための方法を提供する。血清中の抗原の検出に基づいて免疫疾患をスクリーニングするための方法も提供する。

#### 【0023】

特許文献13は、43アミノ酸ペプチドを産生するヒトCD44変異体6の129bpエクソンに結合する特異的抗体を開示している。このモノクローナル抗体は、いくつかのハイブリドーマ細胞株、すなわちMAK<CD44>M-1.1.12、MAK<CD44>M-2.42.3、およびMAK<CD44>M-4.3.16によって産生される。この抗体は、新規CD44v6アミノ酸配列の少なくともヘキサペプチドを含む融合タンパク質から生ずる。さらに、癌診断に使用し得るエクソン6変異体を検出するための免疫アッセイが開示されている。注目すべきことは、開示されたこの抗体の生体外 (in vitro) 作用および生体内 (in vivo) 作用はみられない。

特許文献14は、CD44様ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、このポリヌクレオチドおよびその変異体を用いて組み換えタンパク質を作る方法とを開示している。これらのポリペプチドに対して抗体がクレームされているが、具体例はなく、またそのような抗体を分泌する寄託されたクローンもない。ノーザン・プロットは、いくつかの種類の組織でポリヌクレオチドの出現を示しているが、このポリヌクレオチドの翻訳および発現に付随する証拠は挙げられていない。したがって、このポリペプチドの遺伝子産物に対して作られた抗体 (該抗体は生体外または生体内作用を有すると思われる) が存在していたという証拠はなく、また該抗体がヒトの癌疾患に関連していると考えられる証拠もない。

特許文献15は、CD44の変異体エピトープと反応する抗体と該抗体を用いて変異体を同定する方法とを開示している。この変異体をコードする単離ポリペプチドはラット細胞から単離されたもので、この変異体に対する抗体 (mAb 1.1ASML) は、分子量120kD、150kD、180kD、および200kDのタンパク質を認識する。モノクローナル抗体1.1ASMLの投与は、同系ラットでのラットBSp73ASMLの増殖および転移を遅らせた。注目すべきことに、1.1ASMLは、LCLC97ヒト大細胞肺癌に対する反応性が欠けていたことに示されるように、ヒト腫瘍を認識しない。ヒト・ホモログはLCLC97から単離されるが、このホモログを認識する等価な抗体は産生されなかった。したがって、ラットCD44の変異体に特異的な抗体が作られ、ラット腫瘍の増殖および転移に影響を及ぼすことが示された。より具体的には、本発明者らはこの抗体がヒト癌を認識しないことを指摘している。

#### 【0024】

- 【特許文献1】 米国特許第5,750,102号公報
- 【特許文献2】 米国特許第4,861,581号公報
- 【特許文献3】 米国特許第5,171,665号公報
- 【特許文献4】 米国特許第5,484,596号公報
- 【特許文献5】 米国特許第5,693,763号公報
- 【特許文献6】 米国特許第5,783,186号公報
- 【特許文献7】 米国特許第5,849,876号公報
- 【特許文献8】 米国特許第5,869,268号公報
- 【特許文献9】 米国特許第5,869,045号公報
- 【特許文献10】 米国特許第5,780,033号公報

- 【特許文献 1 1】 米国特許第 5, 9 1 6, 5 6 1 号公報  
【特許文献 1 2】 米国特許第 5, 6 1 6, 4 6 8 号公報  
【特許文献 1 3】 米国特許第 5, 8 7 9, 8 9 8 号公報  
【特許文献 1 4】 米国特許第 5, 9 4 2, 4 1 7 号公報  
【特許文献 1 5】 米国特許第 5, 8 8 5, 5 7 5 号公報

【発明の開示】

【0025】

本発明者らは、癌疾患の処置に有用である個々にカスタマイズされた抗癌抗体を選択するためのプロセスに対する「個別的患者特異的抗癌抗体」と題された米国特許第 6, 1 8 0, 3 5 7 号を既に交付されている。この文献の目的のために、用語「抗体」および「モノクローナル抗体」(mAb)を同義的に用いることが可能であり、ハイブリドーマ(例えば、マウスまたはヒト)によって産生される無傷の免疫グロブリン、免疫複合体、および必要に応じて、免疫グロブリン・フラグメント、ならびに組換え体タンパク質に、例えばキメラ化免疫グロブリン、ヒト化免疫グロブリン、F(ab')フラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、単鎖抗体、組み換え体免疫グロブリン可変領域(Fv)、および融合タンパク質が挙げられる。タンパク質の構造または機能に有意な効果を生ずることなく、一部のアミノ酸配列がポリペプチド内で変異し得ることは、当該技術分野で十分に理解されている。抗体の分子内転位では、一般に、主鎖領域の核酸またはアミノ酸配列を修飾し得る。このような修飾の例として、限定されるものではないが、置換(好ましくは保存的置換)、欠失、または付加が挙げられる。さらに、標準的な化学療法のための手段(例えば、放射性核種)と本発明のCDMABとを抱き合わせることは、この発明の範囲内であり、このことから上記化学療法剤の使用に注目する。CDMABもまた、毒素、細胞障害性部位、酵素(例えば、ビオチン複合酵素)、または造血細胞と結合することができ、それによって抗体複合体が形成される。

【0026】

この出願は、実質的に、癌疾患修飾モノクローナル抗体をコードするハイブリドーマ細胞株の単離を目的とした、357号特許に教示されたような患者特異的抗癌抗体を生産するための方法を利用する。これらの抗体を、1つの腫瘍に対して特異的に作ることができるので、癌治療をカスタマイズすることが可能となる。この出願の文脈の中で、細胞殺害(細胞障害性)または細胞増殖阻害(細胞増殖抑制性)特性のいずれかを持つ抗癌抗体を以下、細胞障害性という。これらの抗体を癌の病期分類および診断の補助として用いることができ、また原発腫瘍と同様に腫瘍転移を処置するために用いることができる。

【0027】

個別的抗癌処置の見込みは、患者を管理する方法の変化をもたらす。可能性のある臨床シナリオは、腫瘍試料が提示に得られて積み上げられることである。この試料から、既存の癌疾患修飾抗体パネルにより腫瘍の型を決めることができる。患者の病期分類を従来どおりに行うけれども、利用可能な抗体を患者のさらなる病期分類に用いることができる。患者に対して既存の抗体を用いて迅速な処置を施すことができ、および/または腫瘍に特異的な抗体パネルを、本明細書中に概説された方法を用いることで、あるいは本明細書中に開示されたスクリーニング方法と同時にファージ・ディスプレイ・ライブラリーを用いることを介して、生産することができる。他の腫瘍が処置したものと同様のエピトープのいくつかを所有することが可能であることから、産生された抗体の全てを抗癌抗体ライブラリーに加える。この方法にもとづいて産生される抗体は、該抗体に結合する癌を持つ患者の多くで癌疾患を処置するのに有用であると思われる。

【0028】

実質的に米国特許第 6, 1 8 0, 3 5 7 号を用いることで、患者の肺腫瘍生検から得た細胞によるマウスの免疫化の後に、マウス・モノクローナル抗体 H 4 6 0 - 1 6 - 2 を得ることができた。H 4 6 0 - 1 6 - 2 抗原は、異なる組織由来の広範囲なヒト細胞株の細胞表面上で発現した。乳癌細胞株 M D A - M B - 2 3 1 (M B - 2 3 1) および皮膚癌細胞株 A 2 0 5 8 は、生体外(in vitro)で H 4 6 0 - 1 6 - 2 の細胞障害作用の影響を受

けやすい。

培養中のMB-231細胞に対するH460-16-2細胞障害性の効果は、これらの癌細胞に対する抗腫瘍活性により、マウスに移植した場合にさらに拡大した(S.N.10/603, 000)に開示)。症状発現前異種移植腫瘍モデルは、治療効力を予測する有効な手段と考えられた。

ヒト乳癌の生体内(in vivo)予防モデルでは、イソタイプ対照抗体(構造およびサイズがH460-16-2と同一であったが、MB-231細胞を結合することはできなかった)と比較して、H460-16-2処置が処置期間中の腫瘍増殖抑制において有意な効果を示した( $p < 0.001$ )。処置相終了時に、H460-16-2投与マウスでの腫瘍増殖は、対照群のわずか1.3パーセントであった。治療後追跡期間中、H460-16-2の処置効果が持続し、処置群での平均腫瘍体積が測定相の終わりまで対照群よりも有意に小さかった。基準の抗体有効性として生存率を使用することで、H460-16-2での死亡リスクが、処置後70日目で、抗体バッファ対照群の約71パーセント( $p = 0.28$ )であると推定された。これらのデータは、H460-16-2処置が対照群と比較して延命効果を与えることを示した。体重の減少および臨床的苦痛を含む障害性の兆候を何ら誘導するものではなかったことから、H460-16-2処置が安全であると考えられた。このように、確立されているヒト乳癌モデルで対照群と比較して、H460-16-2処置による腫瘍増殖の遅延および生存率の強化が得られたことから、H460-16-2処置が有効であった。

#### 【0029】

また、確立された生体内腫瘍モデルでMB-231細胞に対する抗腫瘍活性を示した(S.N.10/603, 000)に概説)。H460-16-2による処置を標準的化学療法薬であるシスプラチンと比較したところ、シスプラチンおよびH460-16-2処置群が、抗体希釈バッファまたはイソタイプ対照抗体のいずれかによって処置された群と比較して、平均腫瘍容積が有意に少なかった( $p < 0.001$ )。H460-16-2処置は、腫瘍抑制を調節した。この腫瘍抑制は、シスプラチン化学療法による腫瘍抑制の3分の2であるが、シスプラチンによる処置で観察されたような有意な体重減少(19.2パーセント)がなく( $p < 0.003$ )、またシスプラチンによる処置で観察されたような処置関連死2件等の臨床的苦痛もみられなかった。H460-16-2が抗腫瘍活性およびその最小障害性を示すことから、H460-16-2が魅力的な抗癌治療薬となった。後処理期間中、H460-16-2は有意な延命効果を示した( $p < 0.02$ )。なぜなら、H460-16-2群で死亡するリスクが、処置後70日を過ぎたところで、イソタイプ対照抗体群での死亡のリスクの約半分であった。観察された延命効果は、処置後120日を過ぎても持続し、H460-16-2処置群の致死率が67パーセントであったのに対してイソタイプ対照群およびシスプラチン処置マウスの致死率は100パーセントであった。H460-16-2は、イソタイプ対照抗体群と比較して26パーセント、腫瘍増殖を遅らせることで、腫瘍抑制を保った。処置後31日目に、H460-12-2は、イソタイプ対照群と比較して、腫瘍増殖を48パーセント減少させることで、腫瘍のサイズを制限した。この腫瘍増殖減少は、処置終了時に観察される49パーセント減少に匹敵する。確立された乳癌腫瘍モデルでは、これらの結果は、処置相を超えて腫瘍抑制効果を保つH460-16-2の可能性を示し、また全身腫瘍組織量を減少せるとともにほ乳類の生存率を高める抗体の能力を示した。

#### 【0030】

確立された生体内乳癌モデルの有益な効果に加えて、化学療法薬(シスプラチン)と組み合わせたH460-16-2処置は、確立した生体前立腺癌モデルではPC-3細胞に対して抗腫瘍活性を呈した。対応のあるt-検定を使用して、H460-16-2とシスプラチンとを組み合わせた処置が、バッファ対照群( $p < 0.0001$ )、シスプラチン単独による処置( $p = 0.004$ )、またはH460-16-2単独による処置( $p < 0.0001$ )よりも、処置後、より短時間で腫瘍増殖を抑制する点で有意な効果があった。処置相終了時に、H460-16-2とともにシスプラチンを与えられたマウスは、バ

ツファ対照群のたった28.5パーセントしか増殖しなかった。PC-3・SCID異種移植モデルに関して、疾患進行の代用指標として、体重を用いることができる。実験した全ての群のマウスで著しい体重減少が生じた。この研究では、全ての群のマウスが処置期間終了までに約23ないし35パーセントの体重減少を示した。H460-16-2を処置した群は、体重減少の度合いが最も低かった(21.7パーセント)。処置後、48日目、ツファ対照群と比較してH460-16-2およびシスプラチンの処置に関連した体重減少の有意な増大はみられなかった( $p = 0.5042$ )。したがって、H460-16-2とシスプラチンとを組み合わせた処置は、ヒト前立腺癌の十分確立されたモデルでのイソタイプ対照処置群と比較して、腫瘍の増殖が遅れた。

#### 【0031】

H460-16-2エピトープが薬物標的であることを実証するために、正常ヒト組織でのH460-16-2の発現を事前に測定した(S.N.10/603,000)。この研究を、抗CD44抗体、すなわちクローンL178(S.N.10/647,818に概説)およびクローンBU75(本明細書に概説)との比較まで広げた。H460-16-2によるIHC染色によれば、組織の大部分がH460-16-2の発現に失敗した。これらの組織には、肝臓、腎臓(管状上皮細胞の周辺染色を除く)、心臓、および肺等の重要な臓器が含まれる。組織染色の結果が示すことは、H460-16-2が種々の細胞型に対しての結合が制限されるが、浸潤マクロファージ、リンパ球、および線維芽細胞への結合を示すことを示唆した。BU75抗体は、類似の染色パターンを示した。しかし、顕著な違いが少なくとも1つあった。すなわち、リンパ球の染色は、H460-16-2と比較して、BU75よりも強度が高かった。

H460-16-2抗原の局在化と、集団(例えば、乳癌患者間)内でのその有病率の決定とが、H460-16-2の治療的使用の評価と有効な臨床試験の設計とに重要である。癌患者の乳癌腫瘍でのH460-16-2抗原発現に対処するために、50人の乳癌患者から得た腫瘍組織試料のスクリーニングを、H460-16-2抗原(S.N.10/603,000)の発現に関しておこない、L178(S.N.10/647,818)と比較した。本研究は、H460-16-2の染色をBU75および抗Her2抗体c-erbB-2と比較した。本研究の結果は、以前の結果と類似しており、組織試料の62パーセントがH460-16-2抗原に関して陽性に染色され、一方乳癌腫瘍の72パーセントがBU75に関して陽性に染色された。患者試料内でのH460-16-2の発現は、染色が悪性細胞に限られていることから、癌細胞に対して特異的であることが示された。H460-16-2は、乳癌患者由来の正常組織試料10個のうち4つを染色し、一方BU75は8つを染色した。H460-16-2およびBU75抗原の両方の乳房腫瘍発現は、悪性細胞の細胞膜に主に局在化して現れ、CD44が治療にとって好適な標的となった。H460-16-2発現を、エストロゲンおよびプロゲステロンというホルモンに対する受容体の乳房腫瘍発現にもとづいて、さらに評価した。これらのホルモンは、乳房腫瘍の進行、処置、および予後にとって重要な役割を演じる。H460-16-2の発現と、エストロゲンまたはプロゲステロンのいずれもの受容体の発現との間で、なんら相関関係は生じなかった。腫瘍細胞の病期、あるいは癌進行の度合いに基づいて腫瘍を分析する場合、ここでもH460-16-2抗原発現と腫瘍病期との間に明らかな相関がなかった。同様の結果は、BU75で得られた。c-erbB-2と比較して、H460-16-2は完全に異なる染色の様相を示しており、H460-16-2抗原に対して陽性である乳房腫瘍組織の52パーセントがHer2発現に対して陰性であり、今までにない標的療法が乳癌患者に求められていることを示した。H460-16-2およびHer2の両方について陽性である乳房腫瘍組織切片間の染色強度にも違いがあった。c-erbB-2抗体もまた、正常乳房組織切片の一つを陽性染色した。

#### 【0032】

H460-16-2の潜在的かつ治療的な利益を広げるために、種々のヒト癌組織内の抗原の頻度および局在化もまた、既に決定されており(S.N.10/603,000)、またクローンL178との比較もなされた(S.N.10/647,818)。これら

の腫瘍型の大部分はまた、L178抗原に陽性であった。ヒト乳房腫瘍組織と同様に、H460-16-2およびL178の局在化は、腫瘍細胞の膜上で生じた。しかし、H460-16-2抗体と比較して、L178による実質的に多くの膜局在化があった。また、H460-16-2およびL178の両方によって染色された腫瘍型のうち、43パーセントの組織がL178抗体によって、より強く染色されることが示された。

文献のIHCデータとの比較に基づいて本明細書中に示したIHCデータに正確に一致するCD44の形状はないように思われる。CD44の標準形は、通常、ヒト脳で発現されるが、H460-16-2抗原は発現されない。総(pan-)CD44イソフォームに対する抗体は、肝臓(クッパー細胞)を染色せず、生殖周期の全ての相で子宮内膜腺を陽性に染色する。H460-16-2抗原は、クッパー細胞上に明らかに存在しており、また生殖周期の分泌子宮内膜腺に存在するだけである。H460-16-2抗原は、明らかに組織マクロファージに存在し、また変異形V4/5およびV8/9は、しばしばマクロファージ染色を示す。抗CD44L178と比較して、類似はしているが異なる結合パターンがH460-16-2に見られたことから、H460-16-2抗原がCD44の特異エピトープであることをBU75が示している。

#### 【0033】

既に概説されたように(S.N.10/647,818)、追加の生化学データもまた、H460-16-2によって認識される抗原がCD44の形状のうちの一つであることを示した。このことは、CD44に対して反応性のあるモノクローナル抗体(L178)が免疫沈降によってH460-16-2に結合するタンパク質であることを示す研究によって支持された。ウェスタン・ブロッティングによる研究もまた、H460-16-2によって認識されるCD44のエピトープがv6またはv10に存在しないことを示唆した。H460-16-2エピトープもまた、炭水化物であることおよび立体配座依存性であることによって区別され、一方多くの抗CD44抗体がCD44のペプチド・タンパク質に向けられている。これらのIHCおよび生化学的結果は、H460-16-2がCD44抗原の変異体と結合することを示した。したがって、証拠の優越は、H460-16-2が、CD44の変異体に存在するユニークな炭水化物依存性立体配座的エピトープのライゲーションを介して抗癌作用を調節することを示している。この発明の目的のために、上記エピトープは、ハイブリドーマ細胞株H460-16-2、その抗原結合フラグメント、またはその抗体複合体にコードされるモノクローナル抗体に結合する能力によって特徴づけられる「CD44抗原部位」として定義される。

#### 【0034】

H460-16-2抗癌作用の背後にあるメカニズムを説明するために、ヒアルロン酸(HA)結合アッセイをおこなった。MDA-MB-231がHAに対して50パーセント付着する上で、平均濃度が1.87(±1.01)μg/mlのH460-16-2を必要とすることがわかった。このような結果から、H460-16-2が、少なくとも部分的に、HAへの結合に関与するCD44上の領域と相互作用し、それによってECMを介して新脈管形成または腫瘍侵襲性の下方制御を通してその抗癌効果を解明し得ることが示された。HA結合アッセイに加え、細胞周期実験を、H460-16-2生体外(in vitro)および生体内(in vivo)抗癌作用が細胞周期の調節によるものであるかどうかを判断するためにおこなった。24時間後かつ20μg/mlのH460-16-2で、イソタイプ対照群と比較して、MDA-MB-231アポトーシス細胞の数が増加した。この効果はまた、用量依存性であるように思われた。したがって、H460-16-2の有効性もまた、全体的または部分的に、そのアポトーシス誘導能によるものと言えるかもしれない。

#### 【0035】

全体として、このデータは、H460-16-2抗原が癌関連の抗原であり、またヒトで発現され、病理学的に関連した癌標的であることを示している。さらに、このデータは、ヒト癌組織に対するH460-16-2抗体の結合も示しており、診断、治療の予知、または予後であるアッセイに適切に利用される。さらに、この抗原の細胞膜局在化は、多

くの非悪性細胞で抗原の発現が欠如していることによる細胞の癌状態を表し、さらに、この観察は、診断、治療の予知、または予後であり得るアッセイに使用される、この抗原、その遺伝子または誘導体、そのタンパク質または変異体の使用を可能にする。

【0036】

他の研究は、抗CD44抗体の使用を伴うもので、H460-16-2によって示されない治療的な可能性に限界がある。H460-16-2は、生体外および生体内抗腫瘍活性の両方を示す。MAK<CD44>M-1.1.12、MAK<CD44>M-2.42.3、およびMAK<CD44>M-4.3.16は、それらに帰する生体外および生体内細胞障害性を持たず、VFF-18およびMaBU36は、何ら固有の腫瘍細胞障害性を示さない。また、生体内腫瘍効果を示す他の抗D44抗体もまた、H140-6-2では明白ではないある種の制限を有する。例えば、ASML1.1、K296、抗CD44、およびIM-78.1は、ラット、マウス、異種モデルで増殖するラットおよびマウス腫瘍に対して、それぞれ生体内抗腫瘍活性を示す。H460-16-2は、ヒト癌モデルで抗腫瘍活性を示す。H460-16-2はまた、ヒトCD44に特異的であり、一方ASML1.1等の抗体はラットCD44のみを認識する。クローン515抗CD44抗体は、ヒト卵巣細胞株の腹膜腫瘍移植を阻害するが、腫瘍増殖の防止または阻害をおこなうものではない。H460-16-2は、SCIDマウス異種移植モデルにおけるヒト乳房腫瘍増殖を抑制することができる。GKW.A3は、抑制性ではあるが確立されたモデルではないモデルにおいてマウスで増殖するヒト転移黒色腫の腫瘍増殖を阻害する能力を持つ抗ヒトCD44モノクローナル抗体である。H460-16-2は、ヒト乳癌の予防的および確立されたマウス異種移植モデルで有意の抗腫瘍活性を示した。したがって、既に説明した抗CD44抗体と比較して、H460-16-2は優れた抗腫瘍特性を有することが、かなり明瞭である。

それは、SCIDマウスにおけるヒト乳房腫瘍で生体外および生体内抗腫瘍活性が示され、ヒトCD44に向けられている。ヒト乳癌の予防的および確立された（より臨床的に関連する）モデルで活性を示すとともに、ヒト前立腺癌の確立されたモデルでシスプラチンによる活性を示す。

【0037】

全体として、この発明は、投与された際には乳類で抗原を発現している癌の全身腫瘍組織量を減少させることが可能であり（したがって疾患進行が遅れる）、また処置を受けたほ乳類の生存期間を延ばすことが可能である治療薬の標的としてのH460-16-2抗原の使用を教示している。この発明はまた、CDMAB（H460-16-2）およびその誘導体を、その抗原に対して使用することで、腫瘍を持つほ乳類での癌の全身腫瘍組織量を減少させ、かつこの抗原を発現する腫瘍を持つほ乳類の生存期間を延ばす。また、この発明は、その抗原に結合した後に、H460-16-2が、ヒアルロン酸と相互作用する癌細胞の能力と相互作用し得ることであり、また癌細胞のアポトーシスを引き越すこともできることを教示する。さらに、この発明はまた、この抗原を発現する腫瘍を持つほ乳類の診断、治療の予測、および予後に有用であり得る癌細胞でH460-16-2抗原の検出を用いることも教示している。

【0038】

もし患者が治療の最初の過程に対して不応性であるか、もしくは転移が生ずる場合、再処置のために腫瘍に対して特異的な抗体を産生するプロセスを繰り返すことができる。さらに、抗癌抗体を、その患者から得た赤血球と結合させ、転移の処置を目的として再注入することができる。転移癌に対してはほとんど有効な処置がなく、また転移は通常、死に到る転帰不良の前兆となる。しかし、一般に転移癌はかなり血管化しており、赤血球細胞による抗癌抗体の送達は腫瘍部位での抗体の濃縮化作用を持つことができる。転移前であっても、大部分の癌細胞はその生存を宿主血液供給に依存しており、赤血球細胞に結合した抗癌抗体は、同様に原発部位（*in situ*）の腫瘍に対して効果的であると考えられる。あるいは、抗体を他の血液原細胞（例えば、リンパ球、マクロファージ、単球、またはナチュラルキラー細胞）に結合させてもよい。

## 【0039】

抗体には5つのクラスがあり、各々がその重鎖によって与えられる機能に関連づけられている。一般に、むき出しの抗体(naked antibody)による癌殺害が抗体依存型細胞調節細胞障害性(ADCC)または補体依存型細胞障害性(CDC)のいずれかによって調節されると考えられる。例えば、マウスIgMおよびIgG2a抗体は、補体系のC-1成分を結合することで、ヒト補体を活性化させることができ、それによって腫瘍溶解をもたらし得る補体活性化の古典的経路が活性化される。ヒト抗体に関しては、補体活性化抗体のほとんどが概ねIgMおよびIgG1である。IgG2aおよびIgG3イソタイプのマウス抗体は、単球、マクロファージ、顆粒球、およびある種のリンパ球による細胞殺害に到るFc受容体を持つ細胞障害性細胞の補充の際に有効である。IgG1およびIgG3イソタイプのヒトの抗体は、ADCCを調節する。

## 【0040】

抗体調節癌殺害についての他の可能性のあるメカニズムは、細胞膜内での種々の化学結合の加水分解を触媒する働きをおこなう抗体ならびにそれに関連した糖タンパク質または糖脂質(いわゆる触媒抗体)の使用を介するものであってもよい。

## 【0041】

抗体調節細胞殺害の機序として、さらに2つの機序があり、これらはより広く受けている。第1の機序は、癌細胞にある推定抗原に対して身体が免疫応答するようにさせるワクチンとしての抗体の使用である。第2は、成長受容体を標的にし、該受容体の機能に干渉し、あるいは受容体の機能が効果的に失われるように下流制御する抗体の使用である。

## 【0042】

したがって、本発明の目的は、ハイブリドーマ細胞株と、該ハイブリドーマ細胞がコードする対応の単離モノクローナル抗体およびその抗原結合フラグメントを単離するために、癌細胞に関して細胞障害性である一方で同時に非癌細胞に対しては相対的に非障害性である特定個人に由来する細胞から癌疾患修飾抗体を生産する方法を利用することである。

本発明のさらなる目的は、PTA-4621としてATCCに寄託されたクローンによってコードされる単離モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントに対して特異的に結合するCD44抗原性部位を発現する細胞の有無を決定するために、PTA-4621としてATCCに寄託されたクローンによってコードされる単離モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを利用する方法を教示することである。

本発明のさらなる目的は、CD44抗原性部位に特異的に結合する抗体である、PTA-4621としてATCCに寄託されたクローンによってコードされた単離モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントの使用を介した癌疾患を有する患者の生存を高める方法を教示することである。

本発明の目的は、CDMABおよびその抗原結合フラグメントを教示することである。

## 【0043】

本発明のさらなる目的は、細胞障害性がADCCを介して調節(mediate)されるCDMABを生産することである。

本発明のさらに別の目的は、細胞障害性がCDCを介して調節(mediate)されるCDMABを生産することである。

本発明のさらなる目的は、細胞障害性が細胞化学結合の加水分解触媒能の作用であるCDMABを生産することである。

本発明のさらに別の目的は、癌の診断、予後、およびモニタリングのための結合アッセイに有用であるCDMABを生産することである。

本発明の他の目的および利点は、この発明の特定の実施形態が図示および例示によって示される以下の説明から明らかになる。

## 【0044】

(図面の簡単な説明)

本特許または出願書類は、カラー仕上げの図面を少なくとも1つ含む。カラー図面を有するこの特許または出願書類の写しは、申請および必要な手数料を支払うことで特許庁が

ら得られる。

図 1。正常ヒト組織アレイから得た扁桃組織切片上で H 4 6 0 - 1 6 - 2 ( A ) および抗 C D 4 4 ( B U 7 5 ) 抗体 ( B ) により得られた結合パターンを示す典型的な顕微鏡写真。H 4 6 0 - 1 6 - 2 に比べて B U 7 5 のほうがリンパ球を強く、かつ広範囲に染色している。両抗体とも胚中心 ( 緑色矢印 ) では、より薄く染色された。倍率は 2 0 0 倍である。

図 2。乳癌腫瘍 ( 浸潤性腺管癌 ) に結合した H 4 6 0 - 1 6 - 2 の典型的な顕微鏡写真。パネル内の黄色および橙色矢印は、それぞれ間質細胞と悪性細胞シートとを示している。倍率は 1 0 0 倍である。

図 3。ヒト乳癌組織アレイから得たパジェット病乳房組織切片上で H 4 6 0 - 1 6 - 2 ( A ) および抗 C D 4 4 ( B U 7 5 ) 抗体 ( B ) により得られた結合パターンを示す典型的な顕微鏡写真。B U 7 5 によって悪性細胞が膜染色されたのに対して、H 4 6 0 - 1 6 - 2 ではネガティブ染色であった。倍率は 4 0 0 倍である。

図 4。ヒト乳癌組織アレイから得た乳房組織切片由来の髄様癌上で H 4 6 0 - 1 6 - 2 ( A ) および抗 H e r 2 ( c - e r b B - 2 ) 抗体 ( B ) により得られた結合パターンを示す典型的な顕微鏡写真。H 4 6 0 - 1 6 - 2 によって悪性細胞が強く膜染色されたのに対して、抗 H e r 2 ではネガティブ染色であった。倍率は 2 0 0 倍である。

図 5。確立した P C - 3 前立腺癌モデルでの腫瘍増殖に対する H 4 6 0 - 1 6 - 2、シスプラチン、H 4 6 0 - 1 6 - 2 + シスプラチン、または緩衝液対照の効果。破線は、抗体が投与されていた期間を示す。データ点は、平均値  $\pm$  S E M を表す。

図 6。確立された P C - 3 前立腺癌モデルでの体重に対する H 4 6 0 - 1 6 - 2、シスプラチン、H 4 6 0 - 1 6 - 2 + シスプラチンまたは緩衝液対照群の効果。

図 7。ヒアルロン酸 ( H A ) に結合する M D A - M B - 2 3 1 乳癌細胞に対する H 4 6 0 - 1 6 - 2、B U 7 5 ( 陽性対照 ) またはイソタイプ対照の効果。

図 8。2 4 時間処置後の M D A - M B - 2 3 1 細胞の細胞周期分布に対する H 4 6 0 - 1 6 - 2 またはイソタイプ対照の効果。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【実施例 1】

###### 【0045】

ハイブリドーマ細胞株 H 4 6 0 - 1 6 - 2 は、ブダペスト条約に従って、寄託番号 P T A - 4 6 2 1 として 2 0 0 3 年 1 1 月 1 1 日付で米国菌培養収集所 ( American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 ) に寄託された。3 7 C F R 1 . 8 0 8 に従って、この寄託者は、寄託された材料の公衆に対する利用可能性に課された全ての制限が特許付与によって変更不能に取り除かれることを保証する。

###### 【0046】

抗体産生：

H 4 6 0 - 1 6 - 2 モノクローナル抗体の産生を、週に 2 回回収および再播種しながらハイブリドーマを C L - 1 0 0 0 フラスコ ( BD Biosciences, Oakville, ON ) で培養することによって、おこなった。この抗体を、プロテイン G セファローズ 4 ファスト・フロー ( Protein G Sepharose 4 Fast Flow ) ( Amersham Biosciences, Baie d'Urfe, QC ) による標準的な抗体精製法に従って、精製した。ヒト、ヒト化、キメラ化、またはマウス抗体であるモノクローナル抗体を利用することは、この発明の範囲内である。

##### 【実施例 2】

###### 【0047】

正常ヒト組織染色

I H C 研究が既にヒトの H 4 6 0 - 1 6 - 2 抗原分布を特徴づけるためにおこなわれており ( S . N . 1 0 / 6 0 3 , 0 0 )、また L 1 7 8 と比較されている ( S . N . 1 0 / 6 4 7 , 8 1 8 )。したがって、本研究は、この H 4 6 0 - 1 6 - 2 抗原は、生化学的方

法で既に決定されたCD44の癌変異体であると考えられることから、H460-16-2を、CD44(BU75)に対して向けられた別の抗体と比較することである。ヒト正常器官組織アレイ(Imgenex, San Diego, CA)を用いて、59個の正常ヒト組織に対する抗体の結合をおこなった。全ての一次抗体(H460-16-2; BU75抗CD44(BLOCAN Scientific Inc., Mississauga, ON); およびマウスIgG<sub>1</sub>陰性対照(Dako, Toronto, ON)を抗体希釈緩衝液(Dako, Toronto, ON)で5 µg/mlの濃度(以前の最適化ステップで最適濃度であることがわかった)に希釈した。陰性対照抗体は、製造元によって全てのほ乳類組織に対して陰性であることがわかっている。IHCに関する方法は、以下の通りである。

#### 【0048】

組織切片をオープンで58℃、1時間加熱することで、脱パラフィン化し、コプリン(Coplin)ジャー内でキシレンに5回(各々4分)浸すことで、脱ろうした。一連の段階エタノール洗浄(100%~75%)で処理した後、切片を水で再水和した。スライドを10 mMクエン酸緩衝液(pH6)(Dako, Toronto, Ontario)に浸し、続いて、電子レンジ(高、中、および低電力レベルにそれぞれ5分間設定)にかけ、最後に冷PBSに浸した。次に、スライドを3パーセントの過酸化水素水に6分間浸し、PBSで3回(各々5分間)洗い、乾燥させ、室温で5分間、ユニバーサル(Universal)ブロッキング溶液(Dako, Toronto, Ontario)とともにインキュベートした。H460-16-2、BU75、またはイソタイプ対照抗体(黒色アスペルギルス(*Aspergillus niger*)グルコースオキシダーゼ(ほ乳類組織に存在せず、また該組織で誘導することはできない酵素)に対する抗体)を、その作用濃度(各抗体に対して5 µg/ml)まで、抗体希釈緩衝液(Dako, Toronto, Ontario)に希釈して、室温で1時間にわたってインキュベートした。スライドをPBSで5分間、それぞれ洗った。一次抗体の免疫活性を、供給元(Dako Envision System, Toronto, Ontario)の指示通りに30分間、室温でHRP結合二次抗体によって、検出/視覚化した。このステップの後、スライドをPBSで各々、5分間、3回にわたって洗浄し、室温で10分間、免疫ペルオキシダーゼ染色用のDAB(3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロリド、Dako, Toronto, Ontario)発色基質を添加することで、呈色反応を生じさせた。スライドを水道水で洗うことで、呈色反応を停止させた。マイヤーのヘマトキリン(Meyer's Hematoxilin)(Sigma Diagnostics, Oakville, ON)を用いて対比染色した後、スライドを段階的なエタノール(75~100%)によって脱水し、キシレンによって透徹させた。封入剤(Dako Faramount, Toronto, Ontario)を用いて、スライドにカバースリップを載せた。スライドの顕微鏡検査をアキシソバート(Axisovort)200(Zeiss Canada, Toronto, ON)を用いておこない、このスライドをノーザン・イクリプス・イメージング・ソフトウェア(Northern Eclipse Imaging Software)(Mississauga, ON)を用いて保存した。結果の読み取り、記録、および解析は、病理学者がおこなった。

#### 【0049】

表1は、一連の正常ヒト組織をH460-16-2およびBU75抗CD44染色した結果をまとめたものである。H460-16-2による組織染色は、以前に記述したもの(S.N.10/603,000)に類似している。ここで再び言及しておくべきことは、この抗原が通常は肝臓、腎臓、および肺等の重要器官の細胞に存在しないことである。H460-16-2抗体は、マクロファージおよびリンパ球に結合し、それらの存在は切片状のいくつかの器官で観察される。しかし、BU75抗CD44抗体によってリンパ球がより強く染色されていた(図1)。

#### 【0050】

H460-16-2に対して陽性であった組織もまた、通常、BU75抗CD44に対して陽性であった(しばしば、強度がより高い)。H460-16-2に対して陰性であった組織もまた、BU75抗CD44に対し、食道およびリンパ節の一試料等のいくつかの例外はあるが、概して陰性であった。これらの結果は、H460-16-2が、BU75およびCD44抗体によって認識されるより小さな群の組織に結合し、組織内での染色

強度もまた、しばしばより低くなる。これらの結果は、H 4 6 0 - 1 6 - 2 の抗原は、正常組織では広範に発現されるものではなく、その上、この抗体は限られた数のヒト組織に特異的である。また、H 4 6 0 - 1 6 - 2 は C D 4 4 のエピトープに特異的であり、これはこれらの I H C 研究で使用される B U 7 5 によって認識されるものとは異なる変異体である。

【 0 0 5 1 】

【 表 1 - 1 】

## ヒト正常組織でのBU75抗CD44とH460-16-2 IHCとの比較

データシート		BU75		H460-16-2	
sec No.	器官	切片評価	組織特異性	切片評価	組織特異性
1	皮膚	+++	角質層除く全層角化細胞	+++	角質層除く全層角化細胞
2	皮膚	+++	角質層除く全層角化細胞	+++	角質層除く全層角化細胞
3	皮下脂肪	-		-	
4	乳房	+	筋上皮	+	筋上皮
5	乳房	++	細管上皮及び筋上皮	+	筋上皮及び繊維芽細胞
6	脾臓	+++	リンパ球	++	リンパ球 (動脈周囲がより強い)
7	脾臓	+++	リンパ球 (動脈周囲がより強い)	+++	リンパ球 (動脈周囲がより強い)
8	リンパ節	+++	リンパ球	+	リンパ球
9	リンパ節	+	リンパ球	-	
10	骨格筋	±	血管	±	血管
11	鼻粘膜	+++	粘膜上皮 (基底層)	CD	
12	肺	++	S MF 及びマクロファージ	+++	リンパ球及びマクロファージ
13	肺	++	肺胞上皮及びマクロファージ	+++	リンパ球及びマクロファージ
14	気管支	+++	軟骨細胞	NR	
15	心臓	-		-	
16	唾液腺	+++	細管及び腺上皮	++	細管及び腺上皮
17	肝臓	+++	クッパー細胞	+++	クッパー細胞
18	肝臓	+++	クッパー細胞	+++	クッパー細胞
19	肝臓	-		-	
20	胆嚢	+++	粘膜基底上皮及びリンパ球	+	粘膜基底上皮及びリンパ球
21	膵臓	++	腺上皮	+	腺上皮
22	膵臓	+++	腺上皮	++	腺上皮
23	扁桃腺	+++	リンパ球 (胚中心で弱い)	++	リンパ球 (胚中心で弱い)
24	食道		粘膜基底上皮層及びリンパ球	-	
25	食道	+++	基底膜上皮層及びリンパ球	+++	基底粘膜上皮層
26	胃体	+++	基底分泌腺の腺上皮及びリンパ球	++	基底分泌腺の腺上皮及びリンパ球
27	胃体	+++	基底分泌腺内腺上皮及びリンパ球	+++	基底分泌腺内腺上皮及びリンパ球
28	胃前庭部	+++	基底分泌腺内腺上皮及びリンパ球	+++	基底分泌腺内腺上皮及びリンパ球
29	胃平滑筋	++	血管及び末梢神経線維	++	血管及び線維芽細胞
30	十二指腸	+++	固有層内リンパ球	++	固有層内リンパ球
31	小腸	++	腺上皮及びリンパ球	+	固有層内リンパ球
32	小腸	+++	基底分泌腺内腺上皮及びリンパ濾胞内リンパ球 (胚中心で強度が劣る)	+++	リンパ濾胞内リンパ球 (胚中心で強度が劣る)
33	虫垂	+++	基底分泌腺内腺上皮及びリンパ濾胞内リンパ球 (胚中心で強度が劣る)	+++	固有層内リンパ球 ±基底分泌腺の腺上皮
34	大腸	+++	基底分泌腺内腺上皮及びリンパ濾胞内リンパ球 (胚中心で強度が劣る)	+++	リンパ球及び末梢神経線維
35	大腸	+++	リンパ球及び内皮細胞	+++	固有層内リンパ球

【 0 0 5 2 】

【 表 1 - 2 】

36	直腸	++	リンパ球及び内皮細胞	+++	リンパ球及び線維芽細胞
37	腎皮質	++	上皮及び血管	±	間質血管
38	腎皮質	±	細管上皮	±	細管上皮
39	腎髄質	++	血管内皮	±	SMF及び線維芽
40	膀胱	++	移行上皮及び血管内皮	++	リンパ球及びマクロファージ ±移行上皮及び血管内皮
41	前立腺	+++	筋上皮	+++	筋上皮
42	前立腺	+++	筋上皮	++	筋上皮
43	精囊	±	内皮及SMF	±	粘膜上皮、内皮及SMF
44	精巣	±	血管内皮	±	血管内皮及び線維芽細胞
45	子宮内膜 増殖細胞	+++	血管内皮及びストロマ並び に隣接子宮筋層	++	血管内皮及びストロマ並びに 隣接子宮筋層
46	子宮内膜 分泌腺	+++	腺上皮、ストロマ、及び上 皮	++	腺上皮、ストロマ、及び内皮
47	子宮筋層	+++	SMF	+++	SMF
48	子宮頸部	+++	粘膜上皮基底層及び血管内 皮	+++	粘膜上皮基底層
49	卵管	++	SMF及び血管内皮	+	SMF及び線維芽細胞
50	卵巣	++	血管SMF及び内皮	±	血管SMF
51	胎盤絨毛	±	血管内皮	±	血管内皮
52	胎盤絨毛	±	血管内皮	±	血管内皮
53	臍帯	-		-	
54	副腎	±	血管内皮	±	内分泌腺
55	甲状腺	±	血管内皮	±	傍濾胞細胞及び血管内皮
56	胸腺	++	リンパ球	±	リンパ球
57	脳白質	-		-	
58	脳灰質	-		-	
59	小脳	-		-	

省略語：SMF：平滑筋繊維、NR：切片は典型的ではない。

#### 【0053】

##### 【実施例3】

##### ヒト乳癌腫瘍組織染色

以前のIHC研究は、H460-16-2抗体がヒト癌を認識する可能性があったかどうかについてH460-16-2抗原とヒト乳癌との癌関連性を決定するために(S.N.10/603, 000)、またそれがどのようにして抗CD44染色とL178とを比較するか(S.N.10/647, 818)についておこなわれた。現在のところ、比較は、BU75抗CD44染色、c-erbB-2抗Her2、および黒色アスペルギルス(Aspergillus niger)グルコースオキシダーゼに特異的な抗体(ほ乳類組織に存在も誘導もされない酵素(負の対照))についておこなった。50人の乳癌患者に由来する一群の乳癌組織と、乳癌患者の非新生乳房組織由来の試料10個とを用いた(Imgenex Corporation, San Diego, CA)。各々の患者について、年齢、性別、対癌米国合同委員会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)腫瘍病期、リンパ節、エストロゲン受容体(ER)、およびプロゲステロン受容体(ER)状態に関する情報が提供された。実施例5からのIHCの手順に従った。全ての抗体を作用濃度5µg/mlで使用し、例外として抗Her2の濃度を1.5µg/mlで使用した。

#### 【0054】

表2および表3は、それぞれ乳癌組織群のH460-16-2およびBU75抗CD44抗体染色をまとめたものである。各々の群は、患者50人から得た腫瘍試料から構成されるものであった。概して、試験した患者50人の62パーセントが、BU75抗CD44に関しては73パーセントであるのに対して、H460-16-2抗原については陽性であった。H460-16-2およびBU75抗CD44が同一組織を染色した例では、該試料の45パーセントがH40-16-2と比較して、BU75抗CD44での染色強度が高かった。H460-16-2およびBU75抗原に関して、乳癌患者由来の正常乳

房組織試料 10 個のうち、それぞれ 4 個および 8 個が陽性であった。エストロゲン受容体状態とプロゲステロン受容体状態とのあいだに、何ら明確な相互関係は認められなかった。それはまた、より高い腫瘍病期によって H 4 6 0 - 1 6 - 2 および C D 4 4 抗原の陽性発現が大きくなる傾向にあるとは思われなかった。

【 0 0 5 5 】

【表 2】

H 4 6 0 - 1 6 - 2 に関するヒト乳癌 I H C のまとめ

		結合スコア							
		合計数	-	+/-	+	++	+++	総陽性数	%陽性
患者試料	腫瘍	50	19	19	4	3	5	31	62
	正常	10	0	1	0	2	1	4	40
ES 状態	ER+	28	13	13	1	1	0	15	54
	ER-	22	6	8	3	0	5	16	73
	未知	0	0	0	0	0	0	0	0
PR 状態	PR+	19	9	8	1	1	0	10	53
	PR-	30	8	14	3	0	5	22	73
	未知	1	0	1	0	0	0	1	100
AJCC 腫瘍病期	T1	4	2	1	1	0	0	2	50
	T2	21	6	9	1	1	4	15	71
	T3	20	9	9	1	0	1	11	55
	T4	5	2	2	1	0	0	3	60

【 0 0 5 6 】

【表 3】

抗 C D 4 4 ( B U 7 5 ) に関するヒト乳癌 I H C サマリー

		結合スコア							
		合計数	-	+/-	+	++	+++	総陽性数	%陽性
患者試料	腫瘍	48	13	6	13	7	9	35	73
	正常	10	2	0	3	2	3	8	80
ES 状態	ER+	27	8	4	10	2	3	19	70
	ER-	21	5	2	3	5	6	16	76
	未知	0	0	0	0	0	0	0	0
PR 状態	PR+	18	4	2	8	2	2	14	78
	PR-	29	8	4	5	5	7	21	72
	未知	1	1	0	0	0	0	0	0
AJCC 腫瘍病期	T1	4	1	2	0	1	0	3	75
	T2	20	7	0	6	2	5	13	65
	T3	19	5	2	5	3	4	14	74
	T4	5	0	2	2	1	0	5	100

【 0 0 5 7 】

H 4 6 0 - 1 6 - 2 染色は、図 2 に示すように、正常細胞と比較して、癌細胞に対して特異的であり、間質細胞が明らかに陰性であり、かつ悪性細胞シートがかなり陽性であった。H 4 6 0 - 1 6 - 2 抗原により見られる細胞局在化のパターンは、大多数の例で細胞膜に限定された。B U 7 5 C D 4 4 抗体は、より多くの乳癌試料を染色し、H 4 6 0 - 1

6 - 2 と比較して細胞質局在化よりも膜の度合いが高かった (表 4)。BU75 抗 CD44 はまた、バジレット病の悪性細胞を染色したが、このことは H460 - 16 - 2 の例では見られなかった (図 3)。H460 - 16 - 2 染色に対して陽性であった乳癌患者由来の正常組織試料もまた、BU75 抗 CD44 染色に対して陽性であった。

【0058】

c - e r b B - 2 と比較して、H460 - 16 - 2 は、相対的に異なる染色の様相を示した。ここでは、H460 - 16 - 2 抗原に対して陽性であった 31 個の乳癌腫瘍組織試料のうち 16 個が Her2 発現に関して陰性であり、依然として満たされていない標的治療薬が乳癌患者にとって必要であることが示されている (表 5、図 4)。H460 - 16 - 2 および Her2 の両方に対して陽性であった乳房腫瘍組織切片間に染色強度の違いもあった。すなわち、H460 - 16 - 2 抗原に対して高度に陽性であったいくつかの乳房腫瘍組織は、Her2 に対しては中程度に陽性であったのみであり、その逆もまたしかりであり、H460 - 16 - 2 抗原が乳癌患者の異なる集団を治療的に標的化することを説明している。c - e r b B - 2 抗体もまた、正常乳房組織切片の一つを陽性に染色した。

【0059】

これらの結果は、H460 - 16 - 2 に対する抗原が乳癌患者のほぼ 2 / 3 で発現されることを示唆している。また、H460 - 16 - 2 処置に適したこれらの大部分が抗 Her2 処置に適するものではなかったと思われる。染色パターンは、患者試料において、抗体が悪性細胞に対して高度に特異的であり、H460 - 16 - 2 抗原が細胞膜に局在化することでそれが魅惑的な薬となり得る標的となることを示した。同様ではあるが、よりいっそう限定された H460 - 16 - 2 対 BU75 抗 CD44 抗体の染色は、CD44 のより制限された変異体である H460 - 16 - 2 エピトープの可能性を再び示す。

【0060】

【表 4 - 1】

ヒト腫瘍および正常乳房に対するBU75抗CD44およびH460-16-2 IHCの比較

データシート				BU75		H460-16-2	
切片 No.	性別	年齢	診断	切片評価	組織特異性	切片評価	組織特異性
1	女	28	浸潤性腺管癌	+/-	腫瘍細胞及びストロマ	+/-	腫瘍細胞
2	女	71	充実性乳頭管癌	+	腫瘍細胞及びストロマ	+	腫瘍細胞
3	女	26	浸潤性腺管癌	+/-	腫瘍細胞及びストロマ	-	
4	女	43	浸潤性腺管癌	+	腫瘍細胞	-	
5	女	39	浸潤性腺管癌	+++	腫瘍細胞	+	腫瘍細胞及び壊死細胞
6	女	46	非浸潤性腺管癌	-		-	
7	女	47	浸潤性腺管癌	+++	腫瘍細胞	+++	腫瘍細胞
8	男	67	浸潤性腺管癌	+	腫瘍細胞及びストロマ	-	
9	女	33	浸潤性腺管癌	+++	腫瘍細胞	-	腫瘍細胞及びストロマ
10	女	47	浸潤性腺管癌	+	腫瘍細胞及びストロマ	+	腫瘍細胞及びストロマ
11	女	49	浸潤性小葉癌	-		-	
12	女	46	浸潤性腺管癌	+	腫瘍細胞及びストロマ	+/-	腫瘍細胞及びストロマ
13	女	39	浸潤性腺管癌	-		+/-	
14	女	43	浸潤性小葉癌	+	腫瘍細胞	+	腫瘍細胞
15	女	54	浸潤性小葉癌	+++	腫瘍細胞	+/-	腫瘍細胞
16	女	58	浸潤性腺管癌	++	腫瘍細胞及びストロマ	++	腫瘍細胞
17	女	37	浸潤性腺管癌	-	腫瘍細胞 +/-ストロマ	-	腫瘍細胞 ±ストロマ
18	女	43	浸潤性腺管癌	+++	腫瘍細胞	+	腫瘍細胞 +++ストロマ
19	女	51	浸潤性腺管癌	+++	腫瘍細胞	++	腫瘍細胞
20	女	80	髄様癌	+++	腫瘍細胞及びリンパ球	+++	腫瘍細胞
21	女	36	浸潤性腺管癌	NR		+++	腫瘍細胞
22	女	59	浸潤性腺管癌	+	腫瘍細胞	+/-	腫瘍細胞 ++ストロマ
23	女	34	非浸潤性腺管癌	+	腫瘍細胞	+/-	腫瘍細胞及び壊死領域
24	女	54	浸潤性腺管癌	-	腫瘍細胞及びストロマ	+/-	腫瘍細胞
25	女	47	浸潤性腺管癌	++	腫瘍細胞	+	腫瘍細胞
26	女	53	浸潤性腺管癌	+	腫瘍細胞及びリンパ球	+/-	腫瘍細胞 ++ストロマ
27	女	59	浸潤性腺管癌	+	腫瘍細胞 ++ストロマ	+/-	腫瘍細胞 ++リンパ球
28	女	60	印環細胞癌	F		-	
29	女	37	浸潤性腺管癌	+/-	腫瘍細胞及びストロマ	+/-	腫瘍細胞

【 0 0 6 1 】

【表 4 - 2】

30	女	46	浸潤性腺管癌	-	腫瘍細胞	+/-	腫瘍細胞
					+ストロマ		+++リンパ球
31	女	35	浸潤性腺管癌	-		-	
32	女	47	浸潤性腺管癌	++	腫瘍細胞	-	腫瘍細胞
							+/-壊死部分
33	女	54	浸潤性腺管癌	+	腫瘍細胞	-	
34	女	47	浸潤性腺管癌	+++	腫瘍細胞	+++	腫瘍細胞
35	女	41	浸潤性腺管癌	-		-	
36	女	38	浸潤性腺管癌	++	腫瘍細胞	+	腫瘍細胞
37	女	55	浸潤性腺管癌	-	腫瘍細胞	-	
					+ストロマ		
38	女	65	浸潤性腺管癌	-	腫瘍細胞	-	腫瘍細胞
					+ストロマ		+ストロマ
39	男	66	浸潤性腺管癌	-	腫瘍細胞及び壊死細胞	-	
40	女	44	浸潤性腺管癌	+/-	腫瘍細胞及びストロマ	-	腫瘍細胞
							+浸潤リンパ球
41	女	52	リンパ節内転移癌	++	腫瘍細胞及びストロマ	+/-	腫瘍細胞及びストロマ
42	女	32	リンパ節内転移癌	+	腫瘍細胞	-	
43	女	58	リンパ節内転移癌	++	腫瘍細胞	++	腫瘍細胞
44	女	52	リンパ節内転移癌	-		-	
45	女	58	リンパ節内転移癌	-	腫瘍細胞	+/-	腫瘍細胞及びリンパ球
					+++リンパ球		
46	女	38	リンパ節内転移癌	+/-	腫瘍細胞及びリンパ球	-	腫瘍細胞
							+リンパ球
47	女	45	リンパ節内転移癌	++	腫瘍細胞	+	腫瘍細胞
48	女	45	リンパ節内転移癌	+	腫瘍細胞	+/-	腫瘍細胞
49	女	29	リンパ節内転移癌	+++	腫瘍細胞	+++	腫瘍細胞
50	女	61	リンパ節内転移癌	+/-	腫瘍細胞	+/-	腫瘍細胞
					+++リンパ球		+++リンパ球
51	女	46	乳頭	+++	角化細胞（角質層を除く全ての層）	++	角化細胞（角質層を除く全ての層）
52	女	47	乳頭	+	腫瘍細胞	-	
53	女	40	正常乳房	++	腺管上皮	-	
54	女	43	正常乳房	+++	腺管上皮及び筋上皮	+++	筋上皮
55	女	40	正常乳房	++	腺管上皮及び筋上皮	++	筋上皮
56	女	40	正常乳房	+++	筋上皮	+/-	筋上皮及び線維芽細胞
					+/-腺管上皮		
57	女	45	正常乳房	-		-	
58	女	44	正常乳房	-		-	
59	女	37	正常乳房	+	腺管基底膜	-	
					+/-腺管上皮		
60	女	51	正常乳房	+	筋上皮及び内皮	-(PD)	

組織

【 0 0 6 2 】

【 表 5 - 1 】

ヒト腫瘍および正常に対するc-erbB-2抗Her2およびH460-16-2 IHCの比較

データシート				C-erbB-2		H460-16-2	
切片 No.	性別	年齢	診断	切片評価	組織特異性	切片評価	組織特異性
1	女	28	浸潤性腺管癌	+	腫瘍細胞	+/-	腫瘍細胞
2	女	71	充実性乳頭管癌	-		+	腫瘍細胞
3	女	26	浸潤性腺管癌	+/-	腫瘍細胞	-	
4	女	43	浸潤性腺管癌	+/-	腫瘍細胞	-	
5	女	39	浸潤性腺管癌	NR		+	腫瘍及び壊死細胞
6	女	46	非浸潤性腺管癌	-		-	
7	女	47	浸潤性腺管癌	+++	腫瘍細胞	+++	腫瘍細胞
8	男	67	浸潤性腺管癌	-		-	
9	女	33	浸潤性腺管癌	+++	腫瘍細胞	-	腫瘍細胞 ++ストロマ
10	女	47	浸潤性腺管癌	++	腫瘍細胞	+	腫瘍細胞及びストロマ
11	女	49	浸潤性小葉癌	PD		-	
12	女	46	浸潤性腺管癌	-		+/-	腫瘍細胞及びストロマ
13	女	39	浸潤性腺管癌	+++	腫瘍細胞位	-	
14	女	43	浸潤性小葉癌	-		++	腫瘍細胞
15	女	54	浸潤性小葉癌	-		+/-	腫瘍細胞
16	女	58	浸潤性腺管癌	-		+	腫瘍細胞 ++壊死領域
17	女	37	浸潤性腺管癌	+++	腫瘍細胞	-	腫瘍細胞 +/-ストロマ
18	女	43	浸潤性腺管癌	-		+	腫瘍細胞 +++ストロマ
19	女	51	浸潤性腺管癌	+	腫瘍細胞	++	腫瘍細胞
20	女	80	髄様癌	-		+++	腫瘍細胞
21	女	36	浸潤性腺管癌	NR		+++	腫瘍細胞及びストロマ
22	女	59	浸潤性腺管癌	-		+/-	腫瘍細胞
23	女	34	非浸潤性腺管癌	+++	腫瘍細胞	+/-	腫瘍細胞及び壊死領域
24	女	54	浸潤性腺管癌	+	腫瘍細胞	+/-	腫瘍細胞
25	女	47	浸潤性腺管癌	-		+	腫瘍細胞
26	女	53	浸潤性腺管癌	+++	腫瘍細胞	+/-	腫瘍細胞 ++ストロマ
27	女	59	浸潤性腺管癌	+	腫瘍細胞	+/-	腫瘍細胞 +++リンパ球
28	女	60	印環細胞癌	-		-	
29	女	37	浸潤性腺管癌	+++	腫瘍細胞	+/-	腫瘍細胞
30	女	46	浸潤性腺管癌	-		+/-	腫瘍細胞及びストロマ
31	女	35	浸潤性腺管癌	-		-	
32	女	47	浸潤性腺管癌	+++	腫瘍細胞	-	腫瘍細胞 +/-壊死部分

【0063】

【表5-2】

33	女	54	浸潤性腺管癌	-		-	
34	女	47	浸潤性腺管癌	+++	腫瘍細胞	+++	腫瘍細胞
35	女	41	浸潤性腺管癌	-		-	
36	女	38	浸潤性腺管癌	++	腫瘍細胞	+	腫瘍細胞
37	女	55	浸潤性腺管癌	+/-	腫瘍細胞	-	
38	女	65	浸潤性腺管癌	-		-	腫瘍細胞 +/-ストロマ
39	男	66	浸潤性腺管癌	-		-	
40	女	44	浸潤性腺管癌	-		-	腫瘍細胞 +浸潤リンパ球
41	女	52	リンパ節内転 移癌	-		+/-	腫瘍細胞及びスト ロマ
42	女	32	リンパ節内転 移癌	-		-	
43	女	58	リンパ節内転 移癌	++	腫瘍細胞	+	腫瘍細胞
44	女	52	リンパ節内転 移癌	+++	腫瘍細胞	-	
45	女	58	リンパ節内転 移癌	-		+/-	腫瘍細胞及びリン パ球
46	女	38	リンパ節内転 移癌	++	腫瘍細胞	-	腫瘍細胞 +リンパ球
47	女	45	リンパ節内転 移癌	-		+	腫瘍細胞
48	女	45	リンパ節内転 移癌	-		+/-	腫瘍細胞
49	女	29	リンパ節内転 移癌	-		+++	腫瘍細胞
50	女	61	リンパ節内転 移癌	-		+/-	腫瘍細胞 ++リンパ球
51	女	46	乳頭	-		++	角化細胞（角質層 を除く全ての層）
52	女	47	乳頭	+++	腫瘍細胞	-	
53	女	40	正常乳房	-		-	
54	女	43	正常乳房	-		+++	筋上皮
55	女	40	正常乳房	+/-	腺管上皮	++	筋上皮
56	女	40	正常乳房	-		+/-	筋上皮及び線維芽 細胞
57	女	45	正常乳房	-		-	
58	女	44	正常乳房	-		-	
59	女	37	正常乳房	-		-	
60	女	51	正常乳房	-		-(PD)	

## 乳房組織

## 【0064】

## 【実施例4】

生体内PC-3確立化学療法組み合わせ腫瘍実験

図5および6を参照すると、6ないし8週齢の雄SCIDマウスに、100万個のPC-3ヒト前立腺ガン細胞を含む100マイクロリットルの生理食塩水を首筋に皮下注射することで、移植した。腫瘍の増殖を、毎週、カリパスを用いて測定した。集団の大部分が移植後21日目で腫瘍容積 $80\text{mm}^3$ （範囲 $50\sim 130\text{mm}^3$ ）に達した時点で、4通りの処理群の各々に、マウス8匹を無作為に割り当てた。H460-16-2抗体、化学治療薬シスプラチン、H460-16-2とシスプラチンとの組み合わせ、あるいは緩衝液対照を、 $2.7\text{mM KCl}$ 、 $1\text{mM KH}_2\text{PO}_4$ 、 $137\text{mM NaCl}$ 、 $20\text{mM Na}_2\text{HPO}_4$ を含む希釈剤によりストック濃度を希釈した後、300マイクロリットルの容量で、抗体またはシスプラチンをそれぞれ15または $6\text{mg/kg}$ で、腹腔内投与した。

次に、H460-16-2または緩衝液対照を第一週目は一週あたり4回投与し、その後一週あたり3回投与し、移植後41日目まで同様のやり方で、合計11回分投薬した。シスプラチン投与は、抗体処置期間の第0日目、5日目、10日目、および15日目におこなった。腫瘍増殖を、移植後48日目または個々の動物がCCACエンドポイントに達するまで、ほぼ7日毎にカリパスを用いて測定した。動物の体重を研究期間中記録した。研究終了時、全ての動物をCCACガイドラインに沿って安楽死させた。

#### 【0065】

対応のあるt検定を用いて、シスプラチンまたはH460-16-2とシスプラチンとの組み合わせによる後処理腫瘍全身腫瘍組織量の減少(図5)がみられた。48日目(処理後7日目)において、シスプラチンおよびH460-16-2を処置することで、バッファ対照( $p < 0.0001$ )、シスプラチン処理単独( $p = 0.004$ )、またはH460-16-2処理単独( $p < 0.0001$ )よりも、処理期間終了間もない腫瘍の増殖を抑制するのに、よりいっそう有意な効果がえられた。PC-3は前立腺癌の悪液質モデルであり、体重の減少に伴って、異種移植モデルでの全身腫瘍組織量および疾患進行の増加が生ずる。図6に示す平均体重減少に示されるように、全ての群のマウスで、顕著な体重減少がみられた。この研究では、全ての群のマウスが処置期間終了までに約23ないし35パーセントの体重減少を示した。H460-16-2で処置した群は、体重減少の度合いが最も低かった(21.7パーセント)。処置終了の直後、対照群と比較して、H460-16-2にシスプラチンを加えての処置に関連した体重のさらなる顕著な減少はみられなかった( $p = 0.5042$ )。したがって、H460-16-2にシスプラチンを加えたものは、ヒト乳癌疾患の周知モデルで、緩衝液対照群と比較して、腫瘍全身腫瘍組織量を低下させた。これらの結果は、ヒトを含むほ乳類の癌治療に対するこの抗体の薬理学的および製薬学的利点を示唆している。

#### 【0066】

##### 【実施例5】

##### ヒアルロン酸(HA)結合アッセイ

MDA-MB-231細胞(既に、FACS分析によってH460-16-2抗原(CD44)が発現されるのが示された)を、組織培養プレートから得た使用済み培地を吸引し、PBSで洗い、各プレートに解離緩衝液5mLを添加し、細胞が離れるまで37°Cで細胞をインキュベートした後に、解離させた。次に、細胞を計数し、50mL管に移した。細胞を1,200rpmで5分間遠心し、培地に懸濁することで1~500万細胞/mLが得られた。次に1mLを2mLの深いウェルの各々のウェルに添加した。このプレートを1200rpmで5分間遠心し、プレートをペーパータオル上で逆さまにすることで過剰な上清を取り除いた。次に、深いウェルプレートをゆっくりとボルテックスし、細胞ペレットを除去し、この細胞ペレットを破壊した。1mLのH460-16-2、BU75(陽性対照、BIOCAN Scientific Inc., Missisauga, ON)またはイソタイプ陰性対照(107.3、BD Biosciences, Oakville, ON)抗体を各ウェルに添加し、次に穏やかにボルテックスをかけることで混合した。次に、プレートを37°Cで2時間インキュベートした。しばらくして、48ウェルプレートを、37°Cで1~2時間にわたり1ウェルあたり4mg/mL HAストック溶液300 $\mu$ Lでインキュベーションすることによって、HAで被覆した。インキュベーション後、過剰のHAを吸引除去し、層流フード内でプレートを完全に空気乾燥させた。抗体細胞インキュベーションを完了させた後、1200rpm、5分間で再び細胞をペレット状にした。深いウェルをペーパータオル上で逆さまにすることで、上清を取り除いた。深いウェルを再びボルテックスすることで、細胞ペレットを解離させ、各々のウェルに対して、2 $\mu$ Mカルセイン含有PBS(MgCl<sub>2</sub>およびCaCl<sub>2</sub>を含む)1.2mLを添加した。細胞を再懸濁させ、250 $\mu$ L/ウェルをHA被覆プレートに移した。次に、HA被覆プレートを37°Cで2時間インキュベートすることで、付着させた。インキュベーション後、付着していない細胞を吸引により取り除いた。次に、いっさいの付着していない細胞または細胞の塊を取り除くために、各ウェルをPBS(MgCl<sub>2</sub>およびCaCl<sub>2</sub>を含む)によって2~3回洗った。プレートの読み取

りをパーキン・エルマー (Perkin-Elmer) HTS 7000 蛍光プレートリーダーでおこない、データをマイクロソフト・エクセル (Microsoft Excel) で分析し、さらに結果の一覧を表6または図7に示した。実験を別々に6回おこなって得た平均値からなる結果によって、平均で  $1.87 (\pm 1.01) \mu\text{g}/\text{mL}$  の H460-16-2 が、HA に対する MDA-MB-231 細胞の結合を 50% 減少させるのに必要であることが明らかになった (図7)。HA に結合している MDA-MB-231 細胞に対する H460-16-2 の効果は、用量依存的であり、 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$  の H460-16-2 によって、HA に対する細胞結合の減少が 60% を超えた (図7)。これらの結果は、H460-16-2 が、少なくとも部分的に、HA への結合に関与する CD44 上の領域と相互関係し、その結果、血管形成の下流制御を介した抗癌効果または ECM を介した腫瘍侵襲性を解明することができた。

【0067】

【表6】

HA に対する MDA-MB-231 細胞結合に対する H460-16-2 の効果のまとめ

実験	50% 接着を生ずる抗体濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
1	2.42
2	0.99
3	2.56
4	0.70
5	1.87
6	1.06
平均値	1.87
標準偏差	1.01

【0068】

【実施例6】

細胞周期アッセイ

MDA-MB-231 の細胞周期に対する H460-16-2 の効果を、FACS 分析を用いて評価した。H460-16-2 で抗体 (0、0.2、2.0、 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) またはイソタイプ対照 (クローン 107.3、BD Biosciences、Oakville、ON) を、24、48、および 72 時間にわたって、MDA-MB-231 乳癌細胞とインキュベートした。処置および未処置の細胞をヨウ化プロピジウムで染色し、単一の細胞をフローサイトメトリで分析することで、相対的な DNA 含有量を見積もった。取得したデータ・セットを、低二倍体染色を示している細胞と同様に単細胞母集団上でゲーティングすることで、BD セルクエスト (CellQuest) を用いて分析した。この分析後、H460-16-2 で 24 時間処理した細胞では、周期性を示す細胞の割合が全体的に減少することが示されるとともに、sub-G<sub>1</sub> 集団の用量依存的増加とを示した。sub-G<sub>1</sub> 集団に現れた細胞は、細胞膜の完全性が失われたことによる DNA の損失があり、アポトーシスを起こした細胞の集団を現す場合がある (図8)。このデータは、H460-16-2 が MDA-MB-231 細胞周期に対する効果を有し、またこの効果がアポトーシス細胞の数を用量依存的に増加させた。

【0069】

証拠の優越性によって示されることは、H460-16-2 が CD44 変異体上に存在する炭水化物依存性立体構造エピトープのライゲーションを介して抗癌効果を調節すること、またこのエピトープは少なくとも部分的に HA に対する CD44 変異体の結合に関与することである。対応する細胞で、このエピトープに対して H460-16-2 の結合が

アポトーシスを誘導するという証拠もある。S . N . 1 0 / 7 1 3 , 4 5 1 では、M D A - M B - 2 3 1 細胞等の発現細胞から同種抗原を免疫沈降させる際に、H 4 6 0 - 1 6 - 2 抗体を用いることでことができることが示されている。さらに、限定されるものではないが F A C S、細胞 E L I S A、または I H C によって示される技術を用いて、4 6 0 - 1 6 - 2 抗体に特異的に結合する C D 4 4 抗原性部位を発現する細胞および/または組織の検出で H 4 6 0 - 1 6 - 2 抗体を使用し得ることを示すことができるかもしれない。

【0070】

したがって、免疫沈降した H 4 6 0 - 1 6 - 2 抗原は、そのような F A C S、細胞 E L I S A、または I H C アッセイを用いて、そのような細胞または組織に対する H 4 6 0 - 1 6 - 2 の結合を阻害することができる。さらに、H 4 6 0 - 1 6 - 2 抗体と同様に、他の抗 C D 4 4 抗体を使用して C D 4 4 抗体の他の形態を免疫沈降および単離することが可能であり、またこの抗原を用いて同一タイプのアッセイを持ち手抗原を発現する細胞または組織に対するそれらの抗体の結合を阻害させることもできる。また、示すことができたことは、C D 4 4 の全ての形態（すなわち、p a n - C D 4 4 抗体）を認識する抗 C D 4 4 抗体を使用してその同種抗原を単離するならば、その抗原はまた、H 4 6 0 - 1 6 - 2 抗原が該抗原を発現する細胞または組織に対して結合することを阻害することができ、それによって上記抗原を発現する細胞および組織上の C D 4 4 のエピトープに対する H 4 6 0 - 1 6 - 2 の結合も示される。あるいは、H 4 6 0 - 1 6 - 2 および p a n - C D 4 4 抗体の比較を、両抗体が存在する競合結合アッセイ、E L I S A、細胞 E L I S A、F A C S、あるいはその他のアッセイで比較することもまた、上記抗原を発現する細胞および組織上の C D 4 4 のエピトープに対する H 4 6 0 - 1 6 - 2 の結合を示すことができる。

【0071】

この明細書で指摘した全ての特許および刊行物は、本発明が属する技術分野の当業者のレベルを示す。全ての特許および刊行物を、あたかも個々の刊行物が具体的かつ個々に参照によって援用されるかのように、同一の程度に参照によって本明細書中に援用する。本発明の特定の形態を例示する一方で、本明細書中に記載または示した構成要素の特定の形態または配置に限定されないことが理解される。種々の変更が本発明の範囲から逸脱することなく可能であり、また本発明が明細書に示し、かつ記載したものに限定されるものではないと考えられることは、当業者にとって明らかである。当業者は、本発明に固有のものと同様に、目的を実施すること、また上記した結果および利点を得ることに、本発明が十分に適していることを容易に理解する。本明細書に記載した一連のオリゴヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、生物学的に関連した化合物、方法、手順、および技術は、例示を意図したものであって範囲を限定することを意図したものではない。ここでの変更および他の用途は、当業者が想到するものであり、本発明の精神の範囲内に包含されるとともに添付した請求の範囲によって定義される。本発明の説明を特定の好ましい実施形態と関連させておこなったが、理解すべきことは、請求項に記載された通りの本発明はそのような特定の実施形態に過度に制限されるべきではないということである。実際、当業者に明らかである本発明を実行するための上記した態様の種々の変更は、別紙の請求の範囲の範囲内にあることを意図している。

【0072】

【図面の簡単な説明】

【図1】 正常ヒト組織アレイから得た扁桃組織切片上で H 4 6 0 - 1 6 - 2 ( A ) および抗 C D 4 4 ( B U 7 5 ) 抗体 ( B ) により得られた結合パターンを示す典型的な顕微鏡写真。H 4 6 0 - 1 6 - 2 に比べて B U 7 5 のほうがリンパ球を強く、かつ広範囲に染色している。両抗体とも胚中心（緑色矢印）では、より薄く染色された。倍率は 2 0 0 倍である。

【図2】 乳癌腫瘍（浸潤性腺管癌）に結合した H 4 6 0 - 1 6 - 2 の典型的な顕微鏡写真。パネル内の黄色および橙色矢印は、それぞれ間質細胞と悪性細胞シートとを示している。倍率は 1 0 0 倍である。

【図3】 ヒト乳癌組織アレイから得たパジェット病乳房組織切片上で H 4 6 0 - 1 6

- 2 ( A ) および抗 C D 4 4 ( B U 7 5 ) 抗体 ( B ) により得られた結合パターンを示す典型的な顕微鏡写真。 B U 7 5 によって悪性細胞が膜染色されたのに対して、 H 4 6 0 - 1 6 - 2 ではネガティブ染色であった。倍率は 4 0 0 倍である。

【図 4】 ヒト乳癌組織アレイから得た乳房組織切片由来の髄様癌上で H 4 6 0 - 1 6 - 2 ( A ) および抗 H e r 2 ( c - e r b B - 2 ) 抗体 ( B ) により得られた結合パターンを示す典型的な顕微鏡写真。 H 4 6 0 - 1 6 - 2 によって悪性細胞が強く膜染色されたのに対して、抗 H e r 2 ではネガティブ染色であった。倍率は 2 0 0 倍である。

【図 5】 確立した P C - 3 前立腺癌モデルでの腫瘍増殖に対する H 4 6 0 - 1 6 - 2 、シスプラチン、 H 4 6 0 - 1 6 - 2 + シスプラチンまたは緩衝液対照の効果。破線は、抗体が投与されていた期間を示す。データ点は、平均値  $\pm$  S E M を表す。

【図 6】 確立された P C - 3 前立腺癌モデルでの体重に対する H 4 6 0 - 1 6 - 2 、シスプラチン、 H 4 6 0 - 1 6 - 2 + シスプラチンまたは緩衝液対照群の効果。

【図 7】 ヒアルロン酸 ( H A ) に結合する M D A - M B - 2 3 1 乳癌細胞に対する H 4 6 0 - 1 6 - 2 、 B U 7 5 ( 陽性対照 ) またはイソタイプ対照の効果。

【図 8】 2 4 時間処置後の M D A - M B - 2 3 1 細胞の細胞周期分布に対する H 4 6 0 - 1 6 - 2 またはイソタイプ対照の効果。

【誤訳訂正 3】

【訂正対象書類名】 図面

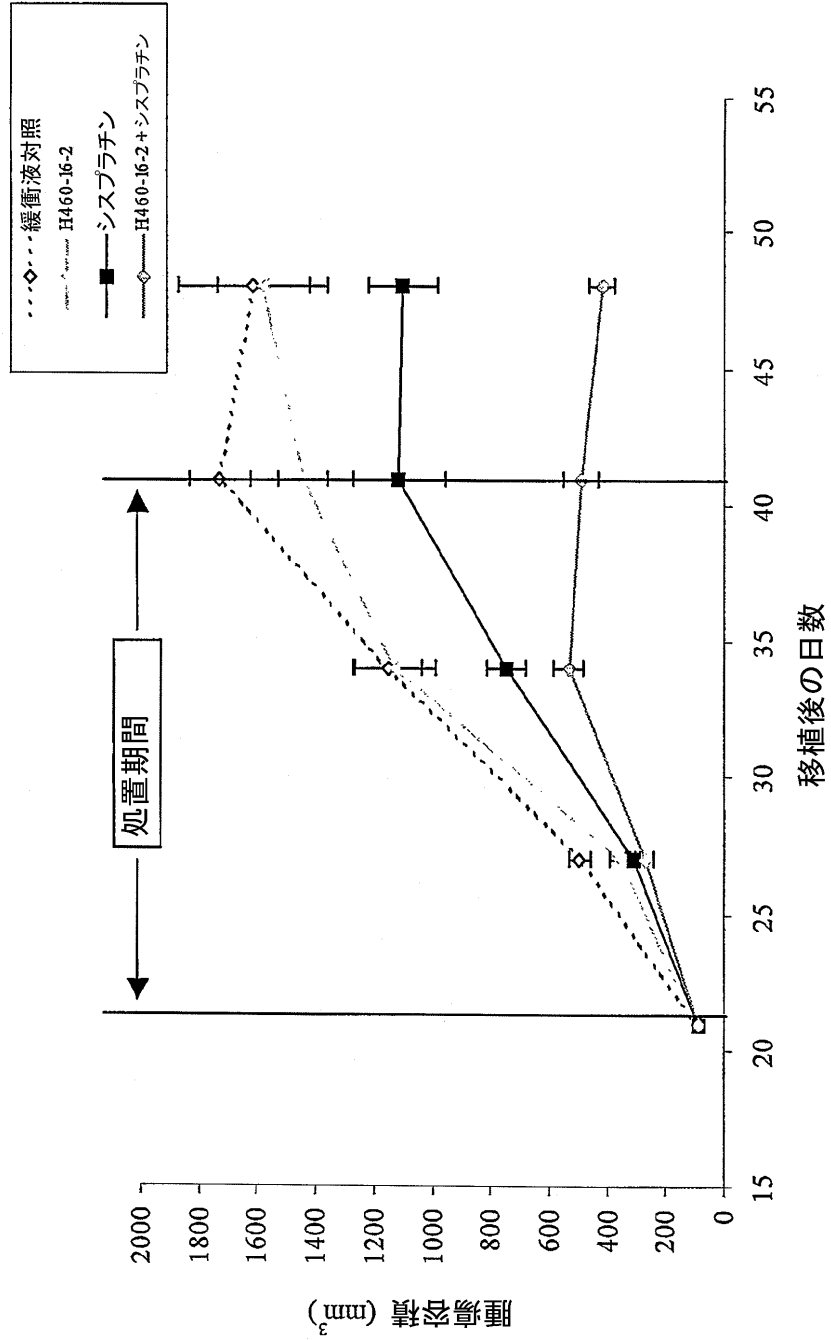
【訂正対象項目名】 図 5

【訂正方法】 変更

【訂正の内容】

【 図 5 】

Figure 5



【 誤訳訂正 4 】

【 訂正対象書類名 】 図面

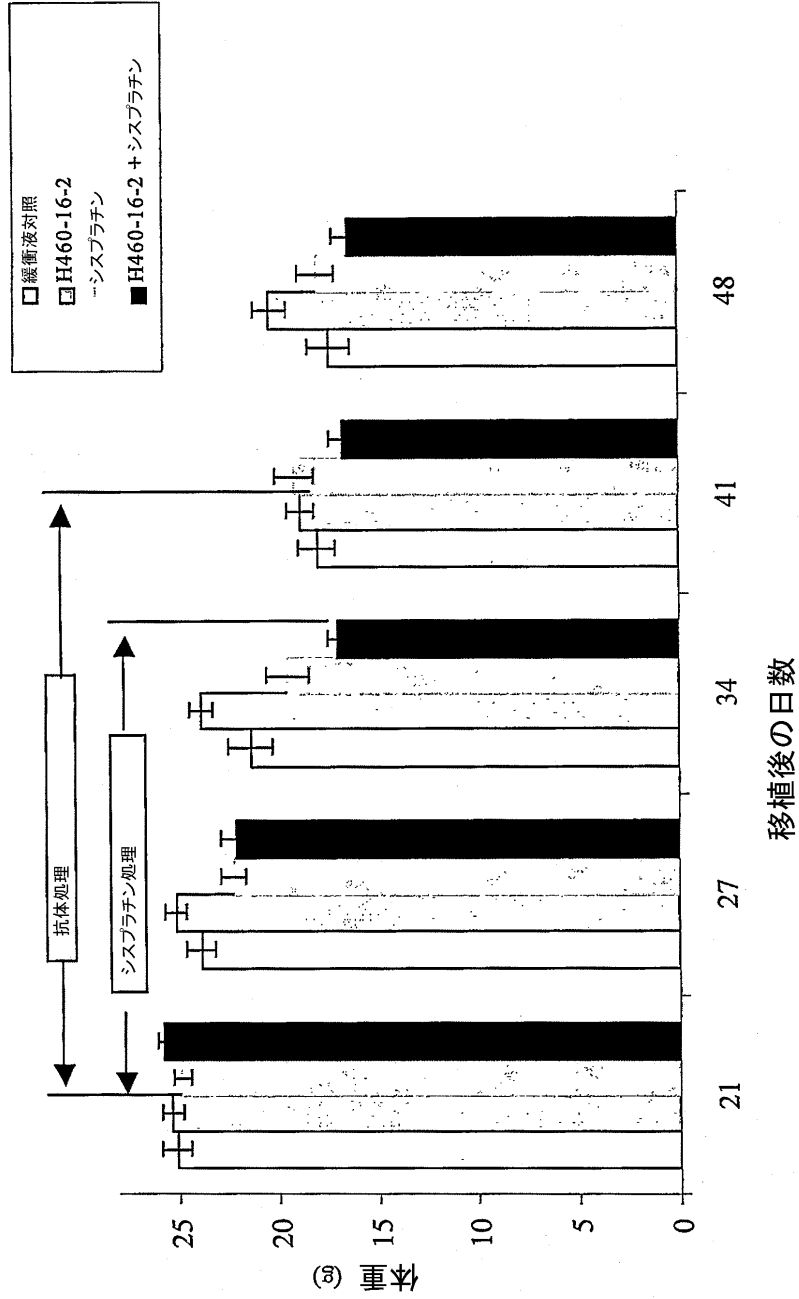
【 訂正対象項目名 】 図 6

【 訂正方法 】 変更

【 訂正の内容 】

【 図 6 】

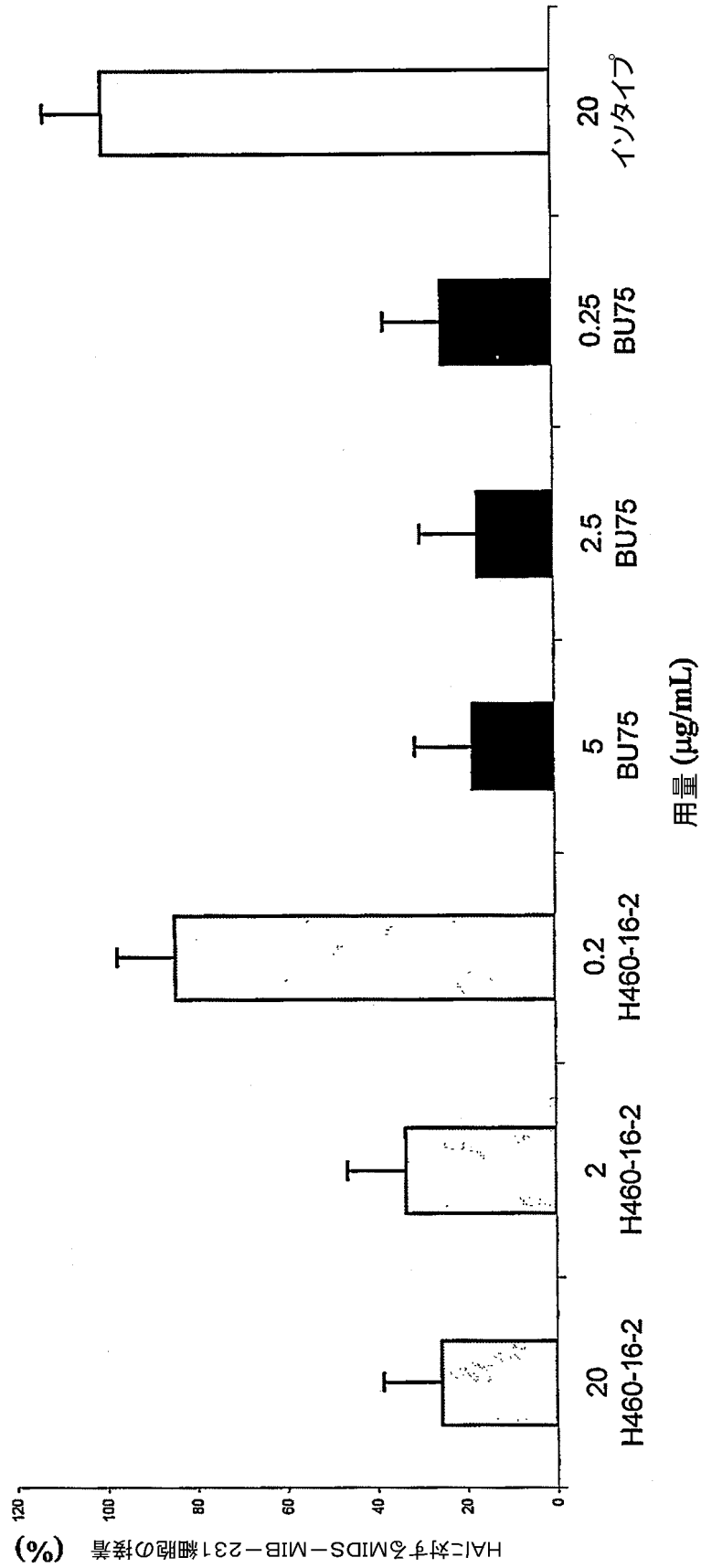
Figure 6



【 誤訳訂正 5 】  
 【 訂正対象書類名 】 図面  
 【 訂正対象項目名 】 図 7  
 【 訂正方法 】 変更  
 【 訂正の内容 】

【 図 7 】

Figure 7



【 誤 訳 訂 正 6 】

【 訂 正 対 象 書 類 名 】 図 面

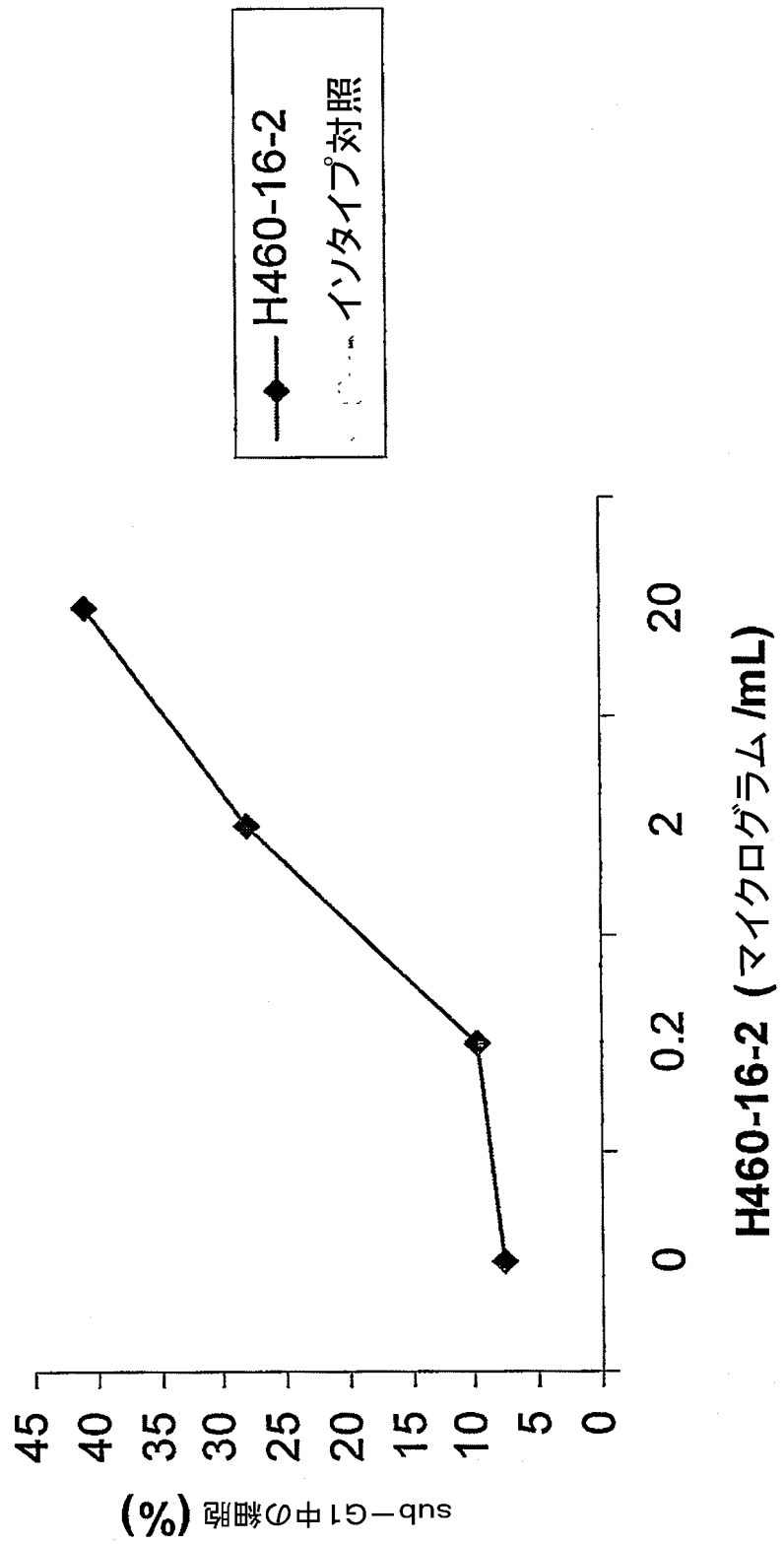
【 訂 正 対 象 項 目 名 】 図 8

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【図 8】

Figure 8



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2005/000441
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7): A61K 39/395, G01N 33/567, G01N 33/574, A61P 35/00, A61K 47/48 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) IPC(7): A61K 39/395, G01N 33/567, G01N 33/574, A61P 35/00, A61K 47/48 CPC: 167/139-167/140 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Canadian Patent Database, PUBMED, Delphion, Derwent, STN cancer, tumor, tumour, monoclonal, antibody, PTA-4621. H460-16-2, ARH460-16-2, CD44, anti-CD44 antibody,		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/055515 A1 (YOUNG and TAKAHASHI) 10 July 2003 abstract pages 36-39, Example 5 Table 5 claims 1-26	1-40
X	US 2004/0001789 A1 (YOUNG et al) 1 January 2004 abstract Figure 5 Tables 3 and 4 Example 5 paragraph [0068] claims 1-6	1-40
<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 or another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles 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 12 July 2005 (12-07-2005)		Date of mailing of the international search report 18 July 2005 (18-07-2005)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001(819)953-2476		Authorized officer John Buchko (819) 953-5926

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CA2005/000441

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6180357 B1 (YOUNG and TAKAHASHI) 30 January 2001 whole document	1-40
Y	NAOR et al. "CD44 in Cancer." Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 2002 vol. 39, pages 527-579 whole document abstract page 553, line 5 - page 554, line 31	1-40
Y	GUO et al. "Inhibition of human melanoma growth and metastasis in vivo by anti-CD44 monoclonal antibody." 15 March 1994 Cancer Research vol. 54, pages 1561-1565 abstract Figures 4-6 Table 1	1-40
X, P	YOUNG et al. "ARH460-16-2: A therapeutic monoclonal antibody targetting CD44 in Her2/neu negative breast cancer" 15 July 2004 Journal of Clinical Oncology vol. 22, page 193s, abstract 2622	1-40
X, P	US2005 /0008646 A1 (YOUNG et al) 13 January 2005 whole document	1-40

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CA2005/000441**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the 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.  Claim Nos. : 1-28 and 33-40 (see remark)

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :

**Remark:** Claims 1-28 and 33-40 are directed to methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy which are not required to be searched by this authority under Rule 39.1(iv) PCT. However, a search has been carried out based on the alleged effects and/or alleged novel use(s) of the monoclonal antibody H460-16-2 (ATTC accession

2.  Claim 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.  Claim Nos. :

because they are dependant 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim 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 claim 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/CA2005/000441

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO03055515 A1	10-07-2003	AU2002226211 A1	15-07-2003
		CA2471206 A1	10-07-2003
		EP1455819 A1	15-09-2004
US2004001789 A1	01-01-2004	US6180357 B1	30-01-2001
		US6657048 B2	02-12-2003
		US6794494 B1	21-09-2004
		US2001003777 A1	14-06-2001
		US2001009665 A1	26-07-2001
		US2003031672 A1	13-02-2003
		US2003054006 A1	20-03-2003
		US2004101530 A1	27-05-2004
		US2004105815 A1	03-06-2004
		US2004105816 A1	03-06-2004
		US2004141913 A1	22-07-2004
		US2004141915 A1	22-07-2004
		US2004141979 A1	22-07-2004
		US2004151665 A1	05-08-2004
		US2004180002 A1	16-09-2004
		US2004197328 A1	07-10-2004
		US2004253653 A1	16-12-2004
		US2004258693 A1	23-12-2004
		US2005002940 A1	06-01-2005
		US2005008646 A1	13-01-2005
		US2005053809 A1	10-03-2005
		US2005063967 A1	24-03-2005
		US2005100542 A1	12-05-2005
		WO2004065421 A1	05-08-2004
		WO2004065422 A2	05-08-2004
		WO2004087205 A1	14-10-2004
		WO2004089989 A1	21-10-2004
		WO2004112834 A1	29-12-2004
		WO2005018667 A1	03-03-2005
		US6180357 B1	30-01-2001
US6794494 B1	21-09-2004		
US2001003777 A1	14-06-2001		
US2001009665 A1	26-07-2001		
US2003031672 A1	13-02-2003		
US2003054006 A1	20-03-2003		
US2004001789 A1	01-01-2004		
US2004101530 A1	27-05-2004		
US2004105815 A1	03-06-2004		
US2004105816 A1	03-06-2004		
US2004141913 A1	22-07-2004		
US2004141915 A1	22-07-2004		
US2004141979 A1	22-07-2004		
US2004151665 A1	05-08-2004		
US2004180002 A1	16-09-2004		
US2004197328 A1	07-10-2004		
US2004253653 A1	16-12-2004		
US2004258693 A1	23-12-2004		
US2005002940 A1	06-01-2005		
US2005008646 A1	13-01-2005		
US2005053809 A1	10-03-2005		
US2005063967 A1	24-03-2005		
US2005100542 A1	12-05-2005		
WO2004065421 A1	05-08-2004		
WO2004065422 A2	05-08-2004		
WO2004087205 A1	14-10-2004		
WO2004089989 A1	21-10-2004		
WO2004112834 A1	29-12-2004		
WO2005018667 A1	03-03-2005		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.  
PCT/CA2005/000441

(continuation of patent family members)

Patent Document Cited In Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
US2005008646 A1	13-01-2005	US6180357 B1	30-01-2001
		US6657048 B2	02-12-2003
		US6794494 B1	21-09-2004
		US2001003777 A1	14-06-2001
		US2001009665 A1	26-07-2001
		US2003031672 A1	13-02-2003
		US2003054006 A1	20-03-2003
		US2004001789 A1	01-01-2004
		US2004101530 A1	27-05-2004
		US2004105815 A1	03-06-2004
		US2004105816 A1	03-06-2004
		US2004141913 A1	22-07-2004
		US2004141915 A1	22-07-2004
		US2004141979 A1	22-07-2004
		US2004151665 A1	05-08-2004
		US2004180002 A1	16-09-2004
		US2004197328 A1	07-10-2004
		US2004253653 A1	16-12-2004
		US2004258693 A1	23-12-2004
		US2005002940 A1	06-01-2005
		US2005053809 A1	10-03-2005
		US2005063967 A1	24-03-2005
		US2005100542 A1	12-05-2005
		WO2004065421 A1	05-08-2004
		WO2004065422 A2	05-08-2004
		WO2004087205 A1	14-10-2004
WO2004089989 A1	21-10-2004		
WO2004112834 A1	29-12-2004		
WO2005018667 A1	03-03-2005		

## フロントページの続き

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

(72)発明者 ハーン、スーザン、イー .

カナダ国、エム6ピー 3エヌ7 オンタリオ、トロント、イニスフリー コート 9

(72)発明者 フィンドレイ、ヘレン、ピー .

カナダ国、エム6ピー 3イー9 オンタリオ、トロント、グレンドワイン ロード 205

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ96 QR48 QS32 QX01

4C085 AA14 AA16 AA25 AA26 AA27 BB22 DD61 EE06

专利名称(译)	显示CD44表面表达的细胞的细胞毒性调节		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007530456A</a>	公开(公告)日	2007-11-01
申请号	JP2007504225	申请日	2005-03-23
[标]申请(专利权)人(译)	阿里亚斯研究公司		
申请(专利权)人(译)	阿里亚斯研究公司		
[标]发明人	ヤングデイヴィッドエスエフ ハーンズーザンイー フィンドレイヘレンピー		
发明人	ヤング、デイヴィッド、エス、エフ。 ハーン、ズーザン、イー。 フィンドレイ、ヘレン、ピー。		
IPC分类号	A61K39/395 A61P35/00 G01N33/53 C12Q1/02 A61K47/48 A61K49/00 C07K16/00 C07K16/28 C07K16/30 G01N33/50 G01N33/566 G01N33/567 G01N33/569 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/566 A61K39/39558 A61K45/06 A61K47/6849 A61K49/0058 A61K51/1027 A61K2039/505 B82Y5/00 C07K16/00 C07K16/2884 C07K16/30 C07K16/3015 C07K2317/73 G01N33/5011 G01N33/5014 G01N33/5082 G01N33/56972 G01N33/574 G01N33/57415 G01N33/57419 G01N33/57423 G01N33/57449 G01N33/57484		
FI分类号	A61K39/395.T A61P35/00 G01N33/53.Y C12Q1/02		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ96 4B063/QR48 4B063/QS32 4B063/QX01 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA25 4C085/AA26 4C085/AA27 4C085/BB22 4C085/DD61 4C085/EE06		
代理人(译)	斎藤和典 伊藤哲也		
优先权	10/810165 2004-03-26 US		
其他公开文献	JP4839305B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

抗体 ( CDMAB ) H460-16-2在治疗表达CD44抗原位点的人类肿瘤中的用途以及分离和鉴定癌细胞的方法。与CD44抗原位点结合的单克隆抗体H460-16-2 ( ATTC登录号PTA-4621 ) 对癌细胞具有细胞毒性。在此, 细胞毒性通过抗体依赖性细胞毒性 ( ADCC ) 和补体依赖性细胞毒性 ( CDD ) 来调节。单克隆抗体H460-16-2可用于延迟人肿瘤中的疾病进展。[选型图]图1

Code	Word	Section	Section	Section	Section
01	Human	01	Human	01	Human
02	Human	02	Human	02	Human
03	Human	03	Human	03	Human
04	Human	04	Human	04	Human
05	Human	05	Human	05	Human
06	Human	06	Human	06	Human
07	Human	07	Human	07	Human
08	Human	08	Human	08	Human
09	Human	09	Human	09	Human
10	Human	10	Human	10	Human
11	Human	11	Human	11	Human
12	Human	12	Human	12	Human
13	Human	13	Human	13	Human
14	Human	14	Human	14	Human
15	Human	15	Human	15	Human
16	Human	16	Human	16	Human
17	Human	17	Human	17	Human
18	Human	18	Human	18	Human
19	Human	19	Human	19	Human
20	Human	20	Human	20	Human
21	Human	21	Human	21	Human
22	Human	22	Human	22	Human
23	Human	23	Human	23	Human
24	Human	24	Human	24	Human
25	Human	25	Human	25	Human
26	Human	26	Human	26	Human
27	Human	27	Human	27	Human
28	Human	28	Human	28	Human
29	Human	29	Human	29	Human
30	Human	30	Human	30	Human
31	Human	31	Human	31	Human
32	Human	32	Human	32	Human
33	Human	33	Human	33	Human
34	Human	34	Human	34	Human
35	Human	35	Human	35	Human
36	Human	36	Human	36	Human
37	Human	37	Human	37	Human
38	Human	38	Human	38	Human
39	Human	39	Human	39	Human
40	Human	40	Human	40	Human
41	Human	41	Human	41	Human
42	Human	42	Human	42	Human
43	Human	43	Human	43	Human
44	Human	44	Human	44	Human
45	Human	45	Human	45	Human
46	Human	46	Human	46	Human
47	Human	47	Human	47	Human
48	Human	48	Human	48	Human
49	Human	49	Human	49	Human
50	Human	50	Human	50	Human
51	Human	51	Human	51	Human
52	Human	52	Human	52	Human
53	Human	53	Human	53	Human
54	Human	54	Human	54	Human
55	Human	55	Human	55	Human
56	Human	56	Human	56	Human
57	Human	57	Human	57	Human
58	Human	58	Human	58	Human
59	Human	59	Human	59	Human
60	Human	60	Human	60	Human
61	Human	61	Human	61	Human
62	Human	62	Human	62	Human
63	Human	63	Human	63	Human
64	Human	64	Human	64	Human
65	Human	65	Human	65	Human
66	Human	66	Human	66	Human
67	Human	67	Human	67	Human
68	Human	68	Human	68	Human
69	Human	69	Human	69	Human
70	Human	70	Human	70	Human
71	Human	71	Human	71	Human
72	Human	72	Human	72	Human
73	Human	73	Human	73	Human
74	Human	74	Human	74	Human
75	Human	75	Human	75	Human
76	Human	76	Human	76	Human
77	Human	77	Human	77	Human
78	Human	78	Human	78	Human
79	Human	79	Human	79	Human
80	Human	80	Human	80	Human
81	Human	81	Human	81	Human
82	Human	82	Human	82	Human
83	Human	83	Human	83	Human
84	Human	84	Human	84	Human
85	Human	85	Human	85	Human
86	Human	86	Human	86	Human
87	Human	87	Human	87	Human
88	Human	88	Human	88	Human
89	Human	89	Human	89	Human
90	Human	90	Human	90	Human
91	Human	91	Human	91	Human
92	Human	92	Human	92	Human
93	Human	93	Human	93	Human
94	Human	94	Human	94	Human
95	Human	95	Human	95	Human
96	Human	96	Human	96	Human
97	Human	97	Human	97	Human
98	Human	98	Human	98	Human
99	Human	99	Human	99	Human
100	Human	100	Human	100	Human

Abbreviations: SMP: Smooth muscle fibers, NR: The section is not representative.