

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5683948号  
(P5683948)

(45) 発行日 平成27年3月11日(2015.3.11)

(24) 登録日 平成27年1月23日(2015.1.23)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>C07K 16/32</b>	<b>(2006.01)</b>	C07K 16/32	ZNA
<b>A61K 39/395</b>	<b>(2006.01)</b>	A61K 39/395	T
<b>A61P 35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A61P 35/00	
<b>G01N 33/574</b>	<b>(2006.01)</b>	G01N 33/574	B
<b>G01N 33/577</b>	<b>(2006.01)</b>	G01N 33/577	B

請求項の数 5 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-507772 (P2010-507772)	(73) 特許権者	509316590
(86) (22) 出願日	平成20年5月14日(2008.5.14)		バンクーバー バイオテック リミテッド
(65) 公表番号	特表2010-529950 (P2010-529950A)		カナダ国 V6P 6R9 プリティッシ
(43) 公表日	平成22年9月2日(2010.9.2)		ユ コロンビア、バンクーバー、ショーネ
(86) 国際出願番号	PCT/CA2008/000932		シー ストリート 9121
(87) 国際公開番号	W02008/138139	(74) 代理人	100080816
(87) 国際公開日	平成20年11月20日(2008.11.20)		弁理士 加藤 朝道
審査請求日	平成23年5月13日(2011.5.13)	(74) 代理人	100098648
(31) 優先権主張番号	60/917,906		弁理士 内田 潔人
(32) 優先日	平成19年5月14日(2007.5.14)	(72) 発明者	リー、チーユー グレゴリー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		カナダ国 V6R 3A4 プリティッシ
(31) 優先権主張番号	61/044,028		ユ コロンビア、バンクーバー、ウェスト
(32) 優先日	平成20年4月10日(2008.4.10)		15番 アベニュー 4133
(33) 優先権主張国	米国 (US)	審査官	戸来 幸男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖を含有する全ての (PAN) 癌のマーカ-

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

FR1と、CDR1重鎖様配列の一部と、FR1及びCDR1の間の接合部の近くに位置するスレオニン又はセリングリコシル化サイトにカップルされる糖(carbohydrate)とから成るエピトープの一部を模倣するRP215モノクローナル抗体に対する抗イディオタイプ抗体を含み、

被験体におけるCA215を発現する癌を処置する方法に使用される、医薬組成物。

【請求項2】

被験体がヒトであることを特徴とする請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

被験体が動物腫瘍モデルであることを特徴とする請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項4】

サンプルにおけるCA215を検出する方法であって、

前記サンプルを、抗ヒトIgG抗体又はその免疫特異性フラグメントを結合させた固形支持体と接触させること、

前記支持体と、標識された、若しくはその後に標識を含むように修飾ないし修正された、RP215モノクローナル抗体、CA215と交差反応性の抗体、又は、それらの免疫特異性フラグメントと、を接触させること、

を含む方法。

【請求項5】

10

20

サンプル中のCA215を検出する方法であって、  
 該方法は、サンドイッチ法の免疫アッセイを実行することを含み、  
 サンドイッチ法において使用されるメンバーの1つは、RP215抗体であり、かつ、  
 サンドイッチ法において使用される他のメンバーはヒトIgGと免疫反応性の抗体である  
 こと、

を特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌細胞又は組織を通常の細胞又は組織及びから識別することができ、そして  
 ヒト被験体における多くの腫瘍で見られるタンパク質マーカーの分野に関する。より特徴  
 的には、本発明は、既知の癌マーカーCA215の糖含有エピトープ及びこのエピトープ  
 を使用する方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

参照によって本願明細書に組み込まれるUS特許第5,650,291(‘291)は  
 、卵巢腫瘍細胞系統(株)に存在し、そして、ヒトの多くの腫瘍にも示される腫瘍関連抗  
 原(CA215)の単離を記載する。この抗原に対してモノクローナル抗体が調製された  
 (RP215モノクローナル抗体を含む)。この抗体を生成するハイブリドーマ細胞系統  
 は、ATCC HB10095としてアメリカ培養細胞系統保存機関(American Type Cu  
 lture Collection)に寄託された。特許‘291は、CA215を、RP215で同定さ  
 れる場合にSDSゲルで60kDの最低分子量を有すると記載する。しかしながら、10  
 0kDから2,000kDに渡る分子量の凝集物が存在することも示された。CA215  
 は免疫親和性のクロマトグラフ的な手法によって精製され、培養した卵巢腫瘍細胞(OC  
 -3-VGH)の抽出物又はそれら細胞の培養培地上澄(cultured shed medium)の何れ  
 かから精製することができた。抗原CA215は、卵巢癌又は(子宮)頸癌を有する患者  
 の血清中において、RP215によって検出することができる「膜関連」可溶性抗原とし  
 て特徴付けられる。該抗原は、どの正常組織においても検出することができなかつた。こ  
 の抗原及びそれを認識するモノクローナル抗体は、Lee, C. Y. G., et al, Cancer Immun  
 ol. Immunother. (1992) 35:19-26による論文にも記載されている。CA215はその論  
 文においてCox-1と命名された。

20

30

【0003】

同一グループによって書かれた、後の論文(Lee, G., et al, J. Clin. Ligand Assay  
 (2006) 29:47-51)に、RP215を採用するサンドイッチ(法)アッセイにおいて、中  
 性pHの過ヨウ素酸による処置が実質的にCA215の免疫反応性を無くすることが報告  
 された。このことが、RP215と反応性のCA215のエピトープが糖を含み得るとい  
 う結論に筆者(ないし発明者)を導いた。

【0004】

RP215によって認識されるCA215のエピトープが全ての癌のおよそ60%に存  
 在すると思われる。その分布のさらなる情報は上記Lee, G., et al, J. Clin. Ligand As  
 say (2006)に見られる。

40

【0005】

特許‘291は、抗原CA215を生成する細胞を標識する(該細胞に対する)免疫反  
 応性抗体を利用することによって、抗原CA215を保有する腫瘍の位置を決定する方  
 法をさらに記載する。種々の放射性同位体でモノクローナル抗体を標識すること、並びにこ  
 れらの抗体に毒素を抱合(接合)すること、そして治療上の使用のための抗体又は免疫毒  
 素の投与が記載された。

[先行技術文献]

[特許文献1] US特許5,650,291

[非特許文献1] Lee, C. Y. G., et al, Cancer Immunol. Immunother. (1992) 35:19

50

-26

[非特許文献2] Lee, G., et al, J. Clin. Ligand Assay (2006)

【0006】

発明の開示

本発明は、エピトープの糖の部分が免疫グロブリンの重鎖様分子の可変領域に位置することを実証することによって、これらの刊行物に記載の研究をさらに洗練し（精度を上げ）、従って、CA215の関連部分のみを含む組成物がワクチンに包含されること、又は標的癌細胞のイメージング（画像診断）に有用な抗体を生成及び精製することを可能にする。この研究は、2つのCA215の形態（1つは膜結合型であり、別の1つは分泌型である）があることも実証する。

10

【0007】

本発明は、CA215のエピトープ領域（ないし部分）から本質的に構成される組成物に向けられる。このエピトープ領域は、糖(carbohydrate)を含み、そして、任意に免疫グロブリン重鎖様の可変領域アミノ酸シーケンスの少なくとも一部を含む。このエピトープは、RP215モノクローナル抗体と特異的に免疫反応性であるが、抗ヒトIgGとは顕著に免疫反応性でない。

【0008】

他の視点において、本発明は、癌を処置するための治療方法及び予防方法における活性成分としての最小のエピトープ又はそれを模倣する抗イディオタイプの抗体の使用に関する。エピトープ及び抗イディオタイプ抗体は、癌の診断又は治療用の試薬として有用な更なるモノクローナル抗体のアフィニティー精製の試薬、そして[該モノクローナル抗体の]同定用の試薬として使用することもできる。

20

【0009】

別の視点において、本発明は、新たなるサンドイッチ法のアッセイにおける構成要素としてCA215に対して向けられた、代替的にモノクローナル抗体又はIgGと免疫反応性である抗体を使用する、CA215の免疫アッセイにおける改良に関する。

【0010】

別の視点において、本発明は、ヒト化形態（ヒューマナイズドフォーム）を含むRP215の修飾形態（ないし変化形態）である改良モノクローナル抗体に関する。RP215のヒト化形態は、治療方法に有用であり、更なる抗腫瘍性部分に抱合（ないし接合：conjugate）され、そのような部分の標的性（ターゲッティング）を改良することができる。

30

【0011】

更なる視点において、本発明は、CA215抗原の分泌型/膜結合型の2つの性質の利点を利用するプロトコル（ないし方法）に関する。そのようなプロトコルにおいて、分泌型形態の検出による体液の診断が行われ、任意的に本発明の改良アッセイシステムを使用し、その後、任意的に処置用の細胞毒性剤、又は局在化用及び/又は処置用の放射線同位体にカップルしたヒト化形態の本発明の抗体を使用して、固形の腫瘍の局在化及び処置が行われる。

なお、本発明には、以下の好ましい実施形態も含まれる。

40

(形態1)

RP215モノクローナル抗体と免疫反応性であるが、抗ヒトIgGとは顕著に免疫反応性でない糖(carbohydrate)含有エピトープから本質的に構成され、

前記糖は、免疫グロブリンの重鎖様アミノ酸シーケンスの可変領域の少なくとも一部にカップルされる物質の組成物。

(形態2)

前記重鎖様アミノ酸シーケンスは、IgG、IgA又はIgM抗体と関連することを特徴とする形態1に記載の組成物。

(形態3)

RP215モノクローナル抗体と免疫反応性である糖保有可変領域IgG様のアミノ酸

50

シーケンスから本質的に構成される物質の組成物。

(形態 4)

R P 2 1 5 モノクローナル抗体と免疫反応性である糖保有可変領域 I g A 様のアミノ酸シーケンスから本質的に構成される物質の組成物。

(形態 5)

R P 2 1 5 モノクローナル抗体と免疫反応性である糖保有可変領域 I g M 様のアミノ酸シーケンスから本質的に構成される物質の組成物。

(形態 6)

前記エピトープが異種性の部分 (モイエティ) にカップルされることを特徴とする形態 1 又は 2 に記載の組成物。

(形態 7)

免疫抗原性の組成物として調製されることを特徴とする形態 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の組成物。

(形態 8)

被験体における癌を処置する方法であって、  
前記癌が、C A 2 1 5 を発現し、  
前記方法が、形態 1 ~ 6 のいずれか 1 つに定義の組成物を含む製剤を前記被験体に投与することを含む方法。

(形態 9)

前記被験体はヒトであり、  
前記方法が、化学的治療剤又は放射線治療で前記被験体を処置することをさらに含むことを特徴とする形態 8 に記載の方法。

(形態 10)

前記被験体は動物腫瘍モデルであることを特徴とする形態 8 に記載の方法。

(形態 11)

被検体の癌を処置する方法であって、  
前記癌が、C A 2 1 5 を発現し、  
前記方法が、R P 2 1 5 モノクローナル抗体に対する抗イディオタイプ抗体を含む製剤を前記被験体に投与することを含む方法。

(形態 12)

前記被検体がヒトであり、  
前記方法が、化学的治療剤又は放射線治療で前記被験体を処置することをさらに含むことを特徴とする形態 11 に記載の方法。

(形態 13)

前記被験体は動物腫瘍モデルであることを特徴とする形態 11 に記載の方法。

(形態 14)

サンプル中の C A 2 1 5 を検出する方法であって、  
該方法は、前記サンプルを、抗ヒト I g G を結合させた固形支持体と接触させること、  
その後、標識された、若しくはその後に標識を含むように修飾ないし修正された R P 2 1 5 モノクローナル抗体、C A 2 1 5 と交差反応性の抗体、又は、これら抗体の何れか一つの免疫特異性フラグメントと、前記支持体とを接触させること、  
を含む方法。

(形態 15)

サンプル中の C A 2 1 5 を検出する方法であって、  
該方法は、サンドイッチ法の免疫アッセイを実行することを含み、  
サンドイッチ法の [ 抗体の ] メンバーの 1 つは、R P 2 1 5 抗体であり、サンドイッチ法の他のメンバーは、抗ヒト I g G と免疫反応性 [ の抗体 ] であること、  
を特徴とする方法。

(形態 16)

ヒト化 R P 2 1 5 抗体又はそのフラグメントを含む組成物。

10

20

30

40

50

(形態 17)

前記 R P 2 1 5 抗体又は [ その ] フラグメントは、抗腫瘍性剤にカップルされることを特徴とする形態 1 6 に記載の組成物。

(形態 18)

抗腫瘍性剤は抗成長因子又は抗成長因子受容体であることを特徴とする形態 1 6 に記載の組成物。

(形態 19)

ヒト患者における固形の腫瘍の診断用及び処置用のプロトコル(ないし方法)であって、

該方法(ないしプロトコル)は、

a) 前記患者からの体液のサンプルを、C A 2 1 5 の存在又は、不在についてアッセイすることによって前記患者を診断すること、ここで、C A 2 1 5 の存在は、前記患者における固形の腫瘍の存在を指示し、そして、

b) 膜結合型 C A 2 1 5 のエピトープに結合するヒト化抗体を前記患者に投与することによって前記患者を処置すること、ここで、前記抗体は、細胞毒素剤に任意的にカップルされること、

を特徴とするプロトコル(ないし方法)。

(形態 20)

前記抗体は、R P 2 1 5 のヒト化形態であることを特徴とする形態 1 9 に記載の方法。あるいは、本発明は以下のように記載され得る。

(付記 1)

R P 2 1 5 モノクローナル抗体と免疫反応性であり、抗ヒト I g G 抗体とは顕著に免疫反応性でなく、

少なくとも C A 2 1 5 の F R 1 の一部、C D R 1 重鎖様配列の一部、F R 1 及び C D R 1 の間の接合部の近くに位置するスレオニン又はセリングリコシル化サイトにカップルされる糖(carbohydrate)から成る、分子。

(付記 2)

異種性の部分(モイエティ)にカップルされる付記 1 に記載の分子。

(付記 3)

付記 1 又は 2 に記載の分子を含む医薬組成物。

(付記 4)

ワクチン組成物として製剤化され、

C A 2 1 5 を発現する癌に対する免疫応答を被験体において誘導することに使用される付記 3 に記載の医薬組成物。

(付記 5)

被験体がヒトであることを特徴とする付記 4 に記載の医薬組成物。

(付記 6)

被験体が動物腫瘍モデルであることを特徴とする付記 4 に記載の医薬組成物。

(付記 7)

付記 1 に記載の分子を模倣する、R P 2 1 5 モノクローナル抗体に対する抗イディオタイプ抗体を含み、

被検体における C A 2 1 5 を発現する癌を処置する方法に使用される、医薬組成物。

(付記 8)

被験者がヒトであることを特徴とする付記 7 に記載の医薬組成物。

(付記 9)

被験体が動物腫瘍モデルであることを特徴とする付記 7 に記載の医薬組成物。

(付記 10)

サンプルにおける C A 2 1 5 を検出する方法であって、

前記サンプルを、抗ヒト I g G を結合させた固形支持体と接触させること、

前記支持体と、標識された、若しくはその後には標識を含むように修飾ないし修正された

10

20

30

40

50

、 R P 2 1 5 モノクローナル抗体、 C A 2 1 5 と交差反応性の抗体、又は、これらの抗体の何れか一つの免疫特異性フラグメントと、を接触させること、

( 付記 1 1 )

サンプル中の C A 2 1 5 を検出する方法であって、

該方法は、サンドイッチ法の免疫アッセイを実行することを含み、

サンドイッチ法において使用される抗体のメンバーの 1 つは、 R P 2 1 5 抗体であり、かつ、サンドイッチ法において使用される他のメンバーは、抗ヒト I g G であること、

を特徴とする方法。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 2 】

【図 1】図 1 は、ヒト I g G、 R P 2 1 5 m A b ( m A b : モノクローナル抗体 ) 及び 3 つの C A 2 1 5 のサンプルそれぞれから遊離した N - 結合型グリカンのフル ( full ) E S I - M S スペクトルである。

【図 2】図 2 は、ヒト I g G、 R P 2 1 5 m A b ( m A b : モノクローナル抗体 ) 及び 3 つの C A 2 1 5 のサンプルそれぞれから遊離した N - 結合型グリカンのフル ( full ) E S I - M S スペクトルである。

【図 3】図 3 は、ヒト I g G、 R P 2 1 5 m A b ( m A b : モノクローナル抗体 ) 及び 3 つの C A 2 1 5 のサンプルそれぞれから遊離した N - 結合型グリカンのフル ( full ) E S I - M S スペクトルである。

【図 4】図 4 は、ヒト I g G、 R P 2 1 5 m A b ( m A b : モノクローナル抗体 ) 及び 3 つの C A 2 1 5 のサンプルそれぞれから遊離した N - 結合型グリカンのフル ( full ) E S I - M S スペクトルである。

【図 5】図 5 は、ヒト I g G、 R P 2 1 5 m A b ( m A b : モノクローナル抗体 ) 及び 3 つの C A 2 1 5 のサンプルそれぞれから遊離した N - 結合型グリカンのフル ( full ) E S I - M S スペクトルである。

【 0 0 1 3 】

【図 6】図 6 は、 O C - 3 - V G H の細胞 ( 上 ) の膜結合型の C A 2 1 5 の存在に対する洗浄の影響を示す。

【 0 0 1 4 】

【図 7】図 7 は、 C A 2 1 5 の分泌型形態に関連するハイブリドーマ細胞系統 ( 株 ) と比較した O C - 3 - V G H の細胞系統 ( 株 ) の分泌パターンを示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 5 】

本発明は、 R P 2 1 5 モノクローナル抗体と免疫反応性である C A 2 1 5 ( 上 ) のエピトープを、この抗原の糖の部分を含むものとして同定し、タンパク質部分のアイデンティティを、免疫グロブリン ( I g G、 I g A 及び I g M のクラスの免疫グロブリンを含む ) の重鎖様分子 ( heavy chain immunoglobulin-like molecule ) として確立する。いくつかの免疫グロブリンの軽鎖様部分 ( light chain immunoglobulin-like moieties ) は、 C A 2 1 5 と関連するよう見えるが、それらは、通常免疫グロブリンにおける [ 割合 ] のように、重鎖に対して 1 : 1 の割合で存在せず、重鎖様部分と関連する糖含有エピトープを保有しない。 C A 2 1 5 は、癌細胞の表面上の未定義の凝集物 ( undefined aggregates ) として存在する。

【 0 0 1 6 】

エピトープ ( R P 2 1 5 によって認識され、一般的に免疫グロブリン [ の表面上 ] に存在しない糖を含み、免疫グロブリンの重鎖様分子の可変領域と関連する ) の同定は、より洗練された免疫原性組成物の生成を許容する ( 該組成物は、次いで、細胞の表面で C A 2 1 5 を示す腫瘍細胞の成長を阻害すること、そして、検出試薬又は免疫毒素として有用な更なる抗体を生成することに有用である ) 。下記の実施例で示されるように、およそ 6 0 % のヒトの癌に存在する、効果的でない ( ないし効率的な ) C A 2 1 5 のエピトープを上述のように使用することで、より効果的な免疫原性組成物を癌の予防及び処置用に調製すること

10

20

30

40

50

ができる。

【0017】

従って、既に確立された癌の進行を減速するワクチン、あるいは検出可能な量の癌細胞（抗原CA215を発現する）の出現を防止するワクチンとして、抗原CA215全体を採用するというよりも、検出及び処置に関連するエピトープを有するCA215の部分のみが採用される必要がある。

【0018】

下記に示すように、エピトープは、実質的に、抗ヒトIgG、抗ヒトIgA又は抗ヒトIgMに対して免疫反応しない抗原の一部（a portion of the antigen）から成る。糖エピトープは、これらのヒト免疫グロブリンの構成成分（composition）と異なり、かつ、  
10 該糖エピトープと免疫反応するモノクローナル抗体RP215の構成成分と異なる構成成分を有する。糖エピトープの構成成分は、およそ1 - 3%のフコース、9 - 15%のN - アセチルガラクトサミン、27 - 30%のN - アセチルグルコサミン、6 - 15%のグルコース及び47 - 51%のマンノースである。これらは、後述の4つのケースにおいて、少なくとも±1 - 2%での、およその数値（figures）である。糖エピトープはN - アセチルノイラミン酸及びN - グリコールノイラミン酸を含まない。

【0019】

エピトープは、糖が結合する可変領域免疫グロブリン重鎖様タンパク質の小さな部分（small portion）を少なくとも含む。

【0020】

かくして、精製抗原CA215は、免疫グロブリン重鎖様分子として同定された（ここで、RP215と免疫反応性のエピトープ部分は、このアミノ酸シーケンスと関連する糖を含む）。「免疫グロブリンの重鎖様分子（immunoglobulin heavy chain-like molecule）」とは、抗免疫グロブリン抗体との免疫反応性を与えることができるアミノ酸シーケンスを含む分子を意味する。従って、本発明の場合には、CA215は、抗IgG、抗IgA及び抗IgMと免疫反応性である。しかしながら、RP215と免疫反応性  
20 のエピトープは、抗IgG、抗IgA及び抗IgMと免疫反応性ではない。従って、CA215のタンパク質部分のアミノ酸シーケンスは、抗免疫グロブリン重鎖抗体に関しては免疫反応性が示される免疫グロブリンの重鎖と十分に相同性（homologous）である。CA215は、免疫グロブリンの軽鎖を認識する抗体とも免疫反応性である。従って、より一般的には、  
30 CA215は、単に「免疫グロブリン様分子」として記述することができる。

【0021】

本発明の同定されたエピトープは、癌の処置及び予防のために、被験体に投与するワクチンの中に処方することができる。製剤及びプロトコルを最適化するために、動物モデル被検体（マウス、ラット、ウサギ、モルモット及び同様のもの）に、そのようなワクチンを投与することができる。ヒト被検体を、本発明の免疫原性組成物と一緒に、放射線療法及び化学療法などの更なる治療（法）で処置することができる。

【0022】

正常及び癌の組織の免疫組織染色[を使用する]実験は、様々なレベルの染色輝度で、本願明細書において同定されたエピトープがいくつかのヒトの癌のタイプに存在すること  
40 を示す。該エピトープは卵巣、頸部、子宮内膜、大腸、胃、腸管、食道、乳房及び肺のヒトの癌に対して非常に強い着色を示す。本願明細書に記載のように、特定の被験体からの腫瘍組織は、免疫染色を使用して、このエピトープの存在及びレベルに関して評価することができ、従って、適するワクチンの設計（エピトープそれ自体で構成するか、あるいは、以下にさらに記載するようなそれを模倣する抗イディオタイプ抗体で構成するか）において有用な情報を提供することができる。

【0023】

癌を患う被験体において内因的に抗体を生成するための本発明のエピトープの使用に加え、エピトープを、更なる抗体（検出に有用であり、それ自体が処置に有用である）を生成することにも使用することができる。本願明細書において使用するように、「抗体」と  
50

は、完全な免疫グロブリン、並びに、F a b、F a b<sub>2</sub>、及びF<sub>v</sub>フラグメントなどの、その免疫特異的フラグメント ( immunospecific fragments ) を含む。抗体は、モノクローナル又は単鎖の抗体であり得る。このモノクローナル抗体は、標準的、かつ周知の技術によって調製し、これらの技術環境の下で、ヒト化形態、あるいはある種と関連する可変領域を、別の ( 種 ) と関連する定常領域にカップルしたキメラ形態を得るように組換え的に操作することができる。組換え体生成のツールを使用するモノクローナル抗体を操作する技術は、よく確立されている。本発明のエピトープは、適する抗体用の精製ツール及び同定ツールとしても使用することができる。

#### 【 0 0 2 4 】

診断に使用するため又はワクチン製剤としてのモノクローナル又はポリクローナル抗体を調製する目的のためであるにしても [ なかろうとも ]、任意の免疫原性の組成物において、適するアジュバント ( フロイントの不完全アジュバント、ミョウバン、本発明の分野において周知の多様な ( ないし多数の ) 他のアジュバントなど ) を [ 本発明の ] 組成物に含むことができる。さらに、その免疫原性を増強するように、エピトープをK L H又はテナスタキソイドなどの更なる部分にカップルすることができる。従って、本発明のエピトープと、更なる異種性のタンパク質との融合タンパク質が、本発明の範囲に含まれる。

10

#### 【 0 0 2 5 】

本発明の特定のエピトープに対する反応 ( 応答 ) において生成された抗体は、放射性同位体、フルオロフォア、そして、( インビトロのアッセイのケースにおいては ) 酵素で標識することができ、癌細胞の存在を検出するために使用することができる。それらは、治療において使用する毒素とカップルすることもできる。

20

#### 【 0 0 2 6 】

免疫抗原性製剤を調製するための本発明の特定のエピトープの使用に加え、このエピトープを模倣する抗イディオタイプの抗体をR P 2 1 5 又はR P 2 1 5 と同様にエピトープを認識する免疫原で免疫化された被験体から単離することができる。抗イディオタイプのモノクローナル抗体は、当該可変領域におけるエピトープに対する抗イディオタイプの反応を誘導するために、マウス又は他の適する被験体を、精製R P 2 1 5 のm A b 又は精製R P 2 1 5 のF a b フラグメント ( 又は精製R P 2 1 5 のヒト化形態 ) で免疫化することによって得られる。例えば、B A L B / C マウスを使用することができる。細胞融合と、R P 2 1 5、そのF a b フラグメント又は本発明のエピトープを認識する他の部分 ( モイエティ ) を使用するスクリーニングとによる通常モノクローナル抗体の調製は、抗イディオタイプであるモノクローナル抗体を同定するだろう。これらの抗イディオタイプのm A b ( モノクローナル抗体 ) は、そのとき、被検体 ( 内 ) において、癌細胞をターゲットする抗体を誘導する免疫原としての役割を果たすことができる。従って、抗イディオタイプの抗体は、癌治療の際、及び他の適用例において、C A 2 1 5 エピトープの代わりとなることができる。

30

#### 【 0 0 2 7 】

本発明の特定のエピトープに適する製剤は、例えば、一般的な免疫抗原性の組成物及び Remington's Pharmaceutical Sciences、最新版、Mack Publishing Co.、Easton、PA ( 本願明細書に引用によって組み込まれる ) に見られる組成物である。投与プロトコルは、症状の性質、担当医師の判断、そして悪性腫瘍の重篤度に依存する。群又は個々を基本単位とするそのようなプロトコルの最適化は、十分に通常の技術を有する者 ( 医師 ) の技能の範疇内である。

40

#### 【 0 0 2 8 】

免疫グロブリン様部分 ( モイエティ ) に付随する ( residing ) ものとしてのC A 2 1 5 エピトープの同定は、この抗原の免疫のアッセイの改良に導いた。従来、モノクローナルR P 2 1 5 は、種々の検出用の標識 ( 酵素、放射性同位体、蛍光分子を含む ) を使用する標準的な免疫アッセイにおいて採用される「サンドイッチ法」の双方のメンバーとして使用されてきた。C A 2 1 5 が通常、重合体の形態で存在し、かつ複数コピーの同様のエピトープが利用可能であるので、このことが可能であった。しかしながら、該アッセイの改

50

良形態は、単量体の形態の C A 2 1 5 も検出することができるように、ヒト免疫グロブリン（好ましくは、I g G）と免疫反応性の抗体をサンドイッチ法の 1 つのメンバーとして採用する。

【 0 0 2 9 】

可変領域をエンコードするヌクレオチドシーケンスの操作を介して R P 2 1 5 の構造においても、改良が考慮される。従って、R P 2 1 5 をヒト化することができ、あるいは他の方法では、その免疫特異性を改良するように修飾（ないし修正）することができる。この抗体のヒト化形態は、治療上の適用に、特に有用である。そのようなヒト化形態は、完全免疫グロブリンであり得、若しくは F a b 又は F a b<sub>2</sub> 部分などの可変領域のみを含むことができ、あるいは組み換え的に生成された単鎖 F<sub>v</sub> 抗体であり得る。R P 2 1 5 の任意の免疫特異的部分は、ヒト被験体内での免疫反応性を上昇させないように修飾（ないし修正）することもできる。

10

【 0 0 3 0 】

そのような抗体又はフラグメント、あるいは [ それらの ] 改変形態を、更なる生物学的に活性化の部分（モイエティ）（免疫グロブリン又は所望でない成長因子と免疫反応性のそのフラグメントを含む抗腫瘍性剤など）にカップルすることができる。これらの抱合体（conjugates）において、R P 2 1 5 は、ターゲティングエージェントとして、並びに、それ自体で抗腫瘍因子としての役割を果たす。従って、これらの R P 2 1 5 の形態は、抗腫瘍性剤（パクリタキセル、ラパマイシン又はフマギリンなど）に、あるいは成長因子又はそれらの受容体（抗 G N R H 受容体、抗 E G F、抗 E G F R、抗 V E G F、抗 V E G F R 及び同様のもの）の阻害因子である部分（モイエティ）にカップルすることができる。

20

【 0 0 3 1 】

本願明細書において使用されるように、「抗腫瘍性剤」とは、上記提示のそれらなどの小（small）分子、並びに、成長因子又はそのような成長因子の受容体に対して向けられたそれらの抗体又はフラグメントを含む。従って、「抗成長因子」又は「抗成長因子受容体」は、これらの部分（モイエティ）と免疫反応性である免疫グロブリン又はそのフラグメントを意味する。

【 0 0 3 2 】

本発明の改良プロトコルにおいて、最初のステップは、体液中での C A 2 1 5 抗原の存在に起因して上皮細胞によって特徴付けられる悪性腫瘍の存在の診断である。そのような [ 体 ] 液は、血清、血漿、血液、尿、唾液及び同様のものを含む。検出は、R P 2 1 5 又は上記のその改変形態を使用して実行することができる。本発明の修飾アッセイも使用することができる。

30

【 0 0 3 3 】

一度診断が行われると、ヒトのケースにおいては、画像化することが可能な標識（放射線同位体、蛍光色素又は発光システムなど）にカップルされたヒト化形態の R P 2 1 5 の注射により、画像を得ることによって、腫瘍の位置を確認することができる。蛍光タンパク質を、融合タンパク質で採用することができ、あるいは他の方法によって抗体に結合することができる。さらに、抗体は、これらの固形の腫瘍の処置用の細胞毒性剤のターゲティングエージェントとして使用することもできる。

40

【 実施例 】

【 0 0 3 4 】

以下の実施例は、本発明を説明するために提供され、本発明を限定するためではない。

[ 実施例 1 ]

糖を含むエピトープを有する分泌型及び膜結合型の両方における免疫グロブリン様分子としての C A 2 1 5 の特徴付け

【 0 0 3 5 】

この実施例において、C A 2 1 5 の免疫グロブリン様の性質が確認され、そして、この

50

癌関連抗原が異なる分子量を有する分泌型及び膜結合型の両方で同時に生成されることが実証された。加えて、R P 2 1 5 と免疫反応性である C A 2 1 5 のエピトープは、糖の部分（モイエティ）を含む。

【 0 0 3 6 】

引用によって（本書に）繰り込まれた U . S . 特許 5 , 6 5 0 , 2 9 1 に記載の方法を使用して、C A 2 1 5 を O C - 3 - V G H の癌培養細胞の培地上澄（分画）（shed medium）から精製した。

【 0 0 3 7 】

精製した C A 2 1 5 の N H <sub>2</sub> - 末端アミノ酸シーケンス解析は、通常のヒト I g G （ V E L V E S G A ） のシーケンスと同様のシーケンスを与えた。

10

【 0 0 3 8 】

C A 2 1 5 の免疫グロブリンの性質を、ウェスタンブロットアッセイによって確認した。O C - 3 - V G H の癌細胞抽出物、培地上澄又はアフィニティ精製した C A 2 1 5 の何れかの C A 2 1 5 タンパク質を [ S D S - P A G E ] によって分離し、該 S D S - P A G E からニトロセルロース膜片に転写した。

【 0 0 3 9 】

酵素標識 R P 2 1 5 と、あるいはアルカリフォスファターゼ（A L P）標識抗ヒト I g G との直接インキュベーションの後、ニトロセルロース片をタンパク質バンドの色検出用の基質（Bio-Rad Labs）とインキュベートした。ニトロセルロース膜片との間接結合アッセイも、一次抗体として非標識 R P 2 1 5 又は抗ヒト I g G を使用し、二次抗体として酵素標識ヤギ抗マウス I g G 又はウサギ抗ヤギ I g G を使用して行った。これらの広範囲実験の結果を表 1 に要約する。

20

[ 表 1 ]

種々の抗体を使用するウェスタンブロットアッセイをプローブして、これらの癌細胞抽出物、培養培地上澄（cultured shed medium）又は精製 C A 2 1 5 由来のニトロセルロース片（上の）検出されたタンパク質バンドの分子量を示す。

一次抗体	二次抗体	ニトロセルロース片の 起源	検出されたタンパク質バンド(1以上)の分子量(kDa)	相対的な染色輝度
RP215-HRP <sup>a</sup>	--	OC-3-VGH 癌細胞	55	+
抗ヒトIgG (Mab)	--	精製CA215	60 25	++ +
	ヤギ抗マウスIgG-ALP	OC-3-VGH 癌細胞	53-70 (ブロード)	+++
RP215 (Mab)	ヤギ抗マウスIgG-ALP	培養培地上清	50-54	+
	ヤギ抗マウスIgG-ALP	精製CA215	50-52	++
	ヤギ抗マウスIgG-ALP	ペプシン処理後の 精製CA215	50-60 24	++ +
抗ヒトIgG (Mab)	ヤギ抗マウスIgG-ALP	OC-3-VGH 癌細胞	55-70 28	+++ ++
	ヤギ抗マウスIgG-ALP	精製CA215	52-60	++
抗ヒトIgA (Mab)	ヤギ抗マウスIgG-ALP	OC-3-VGH 癌細胞	57-70 (ブロード)	++
抗ヒトIgM (Mab)	ヤギ抗マウスIgG-ALP	OC-3-VGH 癌細胞	53-70 (ブロード)	++
抗ヒトIg軽 鎖 (Mab)	ヤギ抗マウスIgG-ALP	OC-3-VGH 癌細胞	46-53 (弱) 20-27	++ +
抗ヒトIg軽 鎖 (Mab)	ヤギ抗マウスIgG-ALP	OC-3-VGH 癌細胞	56 (弱) 23-32	++ +

<sup>a</sup> HRP - ホースラディッシュペルオキシダーゼ

ALP - アルカリフォスファターゼ

【0040】

検出にRP215を使用する直接及び間接ウェスタンブロットアッセイの両方とも、タンパク質が細胞抽出物、培地上澄、あるいはアフィニティ精製CA215の何れであるかに関わらず、同様のタンパク質バンドパターンを与える。強く、ブロードのタンパク質バンドが、60kDaの分子量で観察され、そして、微量のタンパク質バンドも90kDaで検出された。

【0041】

抗ヒトIgGモノクローナル抗体(鎖に特異的)は、ALP標識ヤギ抗ヒトIgGでの直接アッセイ、又は二次マーカーとしてこの抗体を使用する間接アッセイのいずれにおいても、ブロードの60kDaのタンパク質バンド(1以上)を与える。抗ヒトIgG(ラムダ)及び(カッパ)の軽鎖のモノクローナル抗体は、ずっと低い染色輝度であるが、低分子量(25-30kDa)のタンパク質バンド(1以上)も認識する。抗ヒトIgA及びIgMモノクローナル抗体は、RP215モノクローナル抗体によってそれらが認識されると同様の60kDaに似た分子サイズでタンパク質バンドを認識する。

【0042】

示したように、癌細胞由来のIgG相対濃度は、ヒトIgA又はヒトIgMのそれ(IgGの5~10%)よりも顕著に高い。ペプシン消化前及び後のアフィニティ精製CA215のウェスタンブロットは、ペプシン消化の後、RP215モノクローナル抗体によって、低分子の範囲(~30kDa)で、CA215の残りのFabフラグメント(1以上)を検出できることを示した。

【0043】

癌細胞におけるCA215がヒトIgG、ヒトIgA又はヒトIgMと交差反応するこ

10

20

30

40

50

と、そして、RP215によって認識されるユニークなエピトープ（1以上）がこれらの癌細胞由来免疫グロブリン様分子に存在することのさらに直接的な証拠を以下のように得た。モノクローナル抗ヒトIgG（Cox-100）\*、抗ヒトIgA及び抗ヒトIgMを、マイクロウェル（上）に標準的な手順に従って、別々にコートした。OC-3-VGHの細胞からの培地上澄をウェルに加え、RP215-HRPを検出抗体として使用した。サンドイッチ（法）免疫アッセイを、1ステップ、室温、オーバーナイト、1/200 RP215-HRP+ノーマルマウスIgG（10µg/ml）で行った。

【0044】

表2におけるこのアッセイの結果は、ヒト免疫グロブリン分子に対する種々の抗体〔と反応する〕OC-3-VGHの癌細胞の培養培地上澄におけるヒト免疫グロブリン様分子の存在を示す。ODsは、サンプルのOD値であり、ODnは、ネガティブコントロール（培地）のOD値である。（OD: Optical Density）

〔表2〕

コーティングAbs/Ag	キャプチャリング抗体	ODs <sub>650</sub> /ODn <sub>650</sub>
Cox-100 (抗hIgG Mab)	RP215-HRP	13.6
抗hIgA Mab	RP215-HRP	1.7
抗hIgM Mab	RP215-HRP	2.2

h: ヒト

Mab: モノクローナル抗体

Ab: 抗体

Ag: 抗グロブリン

【0045】

表3Aに示すように、OC-3-VGHの癌細胞に存在するCA215に対する種々の抗免疫グロブリン抗体間の直接結合を実証するために、更なるデータを得た。この場合では、一次抗体をサンプルとオーバーナイトで室温でインキュベートし、次にヤギ抗マウスIgG-ALP抗体を1時間、37でインキュベートする二次2ステップELISA法として実験を行った。ODsは、サンプルのOD値であり、ODnは、ノーマルマウスIgGの濃度に対応するOD値である。

〔表3A〕

キャプチャリング抗体	ODs <sub>405</sub> /ODn <sub>405</sub>
1.25 ug/ml 抗hIgG <sub>2</sub> mAb	9.1
2.50 ug/ml 抗hIgG <sub>3</sub> mAb	1.4
1.125 ug/ml Cox-100	12.9
1.125 ug/ml RP-215	11.6
5.00 ug/ml 抗hκ (カッパ) mAb	1.5
5.00 ug/ml 抗hλ (ラムダ) mAb	2.8

【0046】

CA215が、IgGの重鎖を模倣する免疫グロブリン様分子であるという更なる証拠を相同性解析を使用して得た。表3Bは、MALDI-TOF MSシステム解析によ

10

20

30

40

50

て得られた結果を示す。

[表3B]

MALDI-TOF MSによって決定されたCA215のトリプシン(処置)ペプチドの  
のアミノ酸シーケンス相同性解析

ペプチド断片	シーケンス相同性 (%)	
1. K.DVLTITLTPK.V	免疫グロブリン重鎖可変領域 (66%)	
2. K.APQVYTIPPK.E	免疫グロブリン $\gamma$ 重鎖3 (87%)	
3. R.VNSAAFPAIEK.T	免疫グロブリン $\gamma$ 重鎖3 (88%)	
4. K.APQVYTIPKQMAK.D	Ig $\gamma$ -3鎖 C領域 (重鎖病タンパク質) (62%)	
5. R.SVSELPIMHQDWLNGK.E	免疫グロブリン重鎖 (72%)	10
6. K.NTQPIMDTDGSYFVYSK.L	免疫グロブリン $\gamma$ -1重鎖定常領域 (61%)	
7. K.SSGTSYDPVLK.C	免疫グロブリン重鎖可変領域 (64%)	
8. K.VCNYVSWIK.Q	免疫グロブリン重鎖 (75%)	
9. RTLYLQMNSLR	免疫グロブリン重鎖可変領域 (100%)	
10. SLVVAAPDNRNPAFTTMGWL FLK	免疫グロブリン重鎖可変領域 (70%)	
11. GDRVITITWR	免疫グロブリン重鎖可変領域 (88%)	
12. GLSDSVRSCR	免疫グロブリン重鎖可変領域 (75%)	
13. TAKGSTGMEILLSTLENTK	免疫グロブリン重鎖可変領域VH (61%)	
14. KVTCVVVDISKD	免疫グロブリン重鎖 (88%)	20
15. GPLCGCCPGRSSQK	免疫グロブリン可変領域 (43%)	
16. AELGGLLSPR	免疫グロブリン重鎖サブグループVIII V-D-J領域 (85%)	
17. DGSISILGSDDATTCHIVVLR	免疫グロブリン重鎖可変領域 (100%-7/7)	
18. RTLYLQMNSLR	免疫グロブリン重鎖可変領域 (100%)	
19. KCELNCQAMGYR	免疫グロブリン $\gamma$ 鎖V領域 (85%)	
20. LSGSCRSTDSLHPCPPTALPR	免疫グロブリン重鎖可変領域 (33%)	
21. APTVVLMMTK	免疫グロブリン重鎖可変領域 (85%-5/6)	30
22. ATSRGCITIIGGGDTATCCA	免疫グロブリン重鎖可変領域 (69%-9/13)	
23. MSTRYHQAASDSYLELIK	免疫グロブリン重鎖可変領域 (87%-7/8)	
24. SLPGSPKDSHLLSPLR	Ig重鎖 (VH4) V領域 (VDJ)	
25. GGNSGGSSSICYVLLGFIGTSK	免疫グロブリン重鎖VJHI領域 (77%)	
26. AEDTAVYYCAKTLTIR	免疫グロブリン重鎖可変領域 (100%)	
27. GLECIGYMYSSGSSFYNPSLKS	免疫グロブリン重鎖可変領域 (100%)	
28. MAYLQQTLAGPSGTR	免疫グロブリン重鎖可変領域 (88%-8/9)	
29. KGHQDSCPFELTACPNEGCTSQV PR	Ig重鎖可変領域 (75%-6/8)	
30. GLEWVSAVSGSGTTTYADSUK	免疫グロブリン重鎖可変領域 (91%)	
31. LSSVTAADTNVYYCAR	免疫グロブリン重鎖VHDJ領域 (93%)	40
32. AETLVFSTHAVISMR	免疫グロブリン重鎖可変領域 (70%-7/10)	

\* Cox-100は、モノクローナル抗体調製のための標準技術を用い、精製CA215でマウスを免疫し、脾臓を収穫し、細胞融合し、スクリーニングして得られたモノクローナル抗体である。Cox-100は、CA215と反応し、ヒトIgGと交差反応をする。

【0047】

従って、CA215に含まれるシーケンスは、ヒト免疫グロブリンの重鎖のシーケンスに相同性である。

## 【 0 0 4 8 】

表 3 C において、C A 2 1 5 の部分的なアミノシーケンスを、いくつかの他の癌細胞又は以前に（既に）報告した組織の既知のヒト免疫グロブリン重鎖のシーケンスとマップさせた。今や、C A 2 1 5 は単一の良く定義された分子ではなく、多数のヒト免疫グロブリン重鎖分子（例えば、I g G、I g A、I g M 及び V 領域（複数）における多数のバリエーション）の混合物（ないし混合体）であることが明白に確立される。これらの免疫グロブリン混合物のユニークな特徴は、共通して R P 2 1 5 モノクローナル抗体によって認識され得る特異的な糖関連エピトープ（specific carbohydrate-associated epitope）の存在である。

## [ 表 3 C ]

癌細胞からの既知のヒト I g 重鎖のアミノ酸との M A L D I - T O F M S から導出された C A 2 1 5 の部分的なアミノ酸の比較

	FR1	CDR1	
T47D (IgG)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	TSGMR	
ZR75-1 (IgM)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKIS	SYWIG	
ZR75-1 (IgG)	EVQLLES	TYAMT	
SKBR3 (IgG)	QVQLQESGPGLVKPSQTL	SGYYYWS	
SKBR3 (IgA)	EVQLVESGGGLVQPGGSL	SSGMN	
MDA-MB-231(IgM)	EVQLVESGGGLVQPGGSL	SYWMD	
肺癌	EVQLEESGAEVKKPGESLKI	TYWIG	
CA215	KSSGTSYPDVLKC KVCN-----	YVSW	20
	(SLVVAAVAPDNRNPAFT?)	(TMG?)	
	(ATSRGCITIIGGGDTATCCA?)		
	(MAYLQOTLAGPSGTR?)		
	FR2	CDR2	
T47D (IgG)	WVRQAPGKELEVA	PFWNGGSQKYCADSVT	
ZR75-1 (IgM)	WVRQMPGKGLEWMG	I IYPGDS	
ZR75-1 (IGG)	WVRQAPGKGLEWVS	T IAADGTWTSNADFVRG	
SKBR3 (IgG)	RIRQHPGKGLEWIG	YIYYNGSTYENPSLKS	
SKBR3 (IgA)	WVRQASGKGLEWVG	RIGSKAASDTTSYAASVRG	
MDA-MB-231(IgM)	WVRQVP	RISPDGR	
肺癌	WVRQMPGKGLEWMG	I IYPGDS	
CA215	IKQ----- GLEWVS	AVSGSG	30
	(WLFLK?) (GLECIG	YMYSSG	
		SSSFYNPSLKS?) G	
	FR3	CDR3	
T47D (IgG)	GRFTFSETFLRPCSLCKCTV	GITVPHPR	
ZR75-1 (IgM)	QVTISADKSISTAYLQWSSL	QEIVAFS	
ZR75-1 (IgG)	RLTISRDN	DWYDY	
SKBR3 (IgG)	RASISVDTSKNQFSLKLS	DIKHTY	
SKBR3 (IgA)	RFFISR	QGCGGD	
MDA-MB-231 (IgM)	RFTISR	GYLSSH	
肺癌	QVTL	WDVMIG	
CA215	DRVTITWR	TLTIR	40
	(LSSVTAADTNVYYCAR?)		
	(MAYLQOTLAGPSGTR?)		

	JH		CH
T47D (IgG)	YFDSGQGTLVTVSS		ASTKGPSVFPL
ZR75-1 (IgM)	YYMDVWVGKTTVTVSS		GSASPQPFSPS
ZR75-1 (IgG)	WGQGLVLTALL		TVSTGLHQGPGLPP
SKBR3 (IgG)	YNCYMDVWVGKTTVTVSS		GLHQGPGLPP
SKBR3 (IgA)	YYYYGMDVWVGQTTVTVSS		ASPTSPKVF
MDA-MB-231 (IgM)	DYWGRGTLVTVSS		GECIRPNPFPF
肺癌	DYWGQGTQVTVS	SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA	VLGCLV
		KDYFPEPVTV	
CA215	.....	..	TAKGSTGMEILL STLENTK (?)..

10

CA215 (定常領域)

----GNSGGSSSICYVLLGFIGTSKLSGSCRSTDSLHPCPTALPRAELGGLLSPRKDVLITLTPK  
VTCVVVDISKD-----RSVSELPIMHQDWLNGKERVNSAAFPAPIEKTAPQVYTIPPKEQMAKD----  
---KGHQDSCPFELTACPNEGCTSQVPRKNTQPIMDTDGSYFVYSKL

注：以下のシーケンスは微小不均一性のためマップすることができなかった。

: 1. GPLCGCCPGRSSQK ; 2. APTVVLMMTK ; 3. 3MSTRYHQAASDSYLELIK ; 4. SLPGPSKDSHLLSPLR

【 0 0 4 9 】

表 3 D に、MALDI - TOF MS 及び RT - PCR から導出された CA 2 1 5 の定常領域におけるアミノ酸シーケンスと、GenBank からの抗ヒト結腸（大腸）癌重鎖のアミノ酸シーケンスとの比較を示す。

[ 表 3 D ]

20

RT - PCR 及び MALDI - TOF MS から推定された CA 2 1 5 のアミノ酸シーケンス中の定常領域におけるアミノ酸シーケンスと、抗ヒト結腸（大腸）癌重鎖 (Anti- human Colon Carcinoma heavy chain: AHCCHC gb|AAB28159.1|) とのアミノ酸シーケンスの比較

---

AHCCHC	PKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQF
CA215 by MALDI-TOF MS	KDVLITLTPKVTCVVVDISKD..... <u>LSTLE</u>
CA215 by RT-PCR	..... <u>VEVHNAKTKPREEQF</u>

30

AHCCHC	NSTFRSVSE LP I MHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISK TKG-----
CA215 by MALDI-TOF MS	N - <u>TKRSVSE LP I MHQDWLNGKE</u> ..... RVNSAAFPAPIEKT.....
CA215 by RT-PCR	<u>NSTYRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGTRGC</u>

AHCCHC	-----RPKAPQVYT IPPPKEQMAKD
CA215 by MALDI-TOF MS	..... KAPQVYT IPP -KEQMAKD
CA215 by RT-PCR	<u>EGHMDRGQLGPPSALGVTAVPTSVPTGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV</u>

40

AHCCHC	SLTCMI TDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKL
CA215 by MALDI-TOF MS	--- TCYVVD- <u>ISKD</u> ... ..... KNTQPIMDTDGSYFVYSKL
CA215 by RT-PCR	<u>SLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYK TT</u>

---

【 0 0 5 0 】

CA 2 1 5 の糖の部分が、サンドイッチアッセイにおけるこの抗原の免疫反応性を破壊する過ヨウ素酸の能力を示すという以下の検証結果によって解析された。それに従って、エピトープにおける糖の存在を確立する。検証を以下のように行った：

【 0 0 5 1 】

PBS で洗浄した OC - 3 - VGH の癌細胞（密度 1 x 1 0 <sup>6</sup> 細胞 / ml ）を 1 0 0 m M Na IO <sub>4</sub> で 3 0 分間インキュベートし、細胞を 0 . 5 % BSA 含有 PBS で洗浄

50

し、次に、 $1 \times 10^4$  細胞/ウェルでマイクロウェル(上)で乾燥させた。細胞をコートしたマイクロウェルを、次に、0.5% BSA 含有 PBS でブロック(ブロッキング)し、そして、ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識された RP215 (RP215-HRP) を使用する直接結合酵素免疫アッセイを 37 で 1 時間行い、その後、十分洗浄し、TMB 基質でカラー現像(color development)した。比較のために、ウェルを、コントロールとしての役割を果たす  $\text{NaIO}_4$  処理無しの癌細胞でコートした。RP215-HRP と、過ヨウ素酸で処理した癌細胞コートウェルとの間の結合は劇的に減少した。さらに、 $10 \sim 100 \mu\text{g/ml}$  のヤギ抗ヒト IgG の存在は、癌細胞でコートされたウェルに RP215-HRP が結合することを投与量依存的態様で減少させ、ヤギ抗ヒト IgG が、完全な CA215 抗原に結合することについて、RP215-HRP と競合することを指し示した。この研究の結果を表 4 に要約する。

10

[表 4]

OC-3-VGH の癌細胞への  $\text{NaIO}_4$  処理による、RP215-HRP の癌細胞でコートしたウェルへの結合に対する影響、並びに、ヤギ抗ヒト IgG の存在下におけるその結合阻害を明らかにするための直接結合アッセイ

アッセイ条件	450nmでの光学密度(Optical Density)	
	$\text{NaIO}_4$ 処理無し	$\text{NaIO}_4$ 処理有り
RP215-HRP ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) + ノーマルマウス IgG ( $10 \mu\text{g/ml}$ )	2.153 (100%) <sup>a</sup>	0.797 (37%)
RP215-HRP ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) + ノーマルマウス IgG ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) + ヤギ抗ヒト IgG ( $20 \mu\text{g/ml}$ )	0.961 (45%)	0.333 (15%)
RP215-HRP ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) + ノーマルマウス IgG ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) + ヤギ抗ヒト IgG ( $50 \mu\text{g/ml}$ )	0.471 (22%)	0.252 (12%)
RP215-HRP ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) + ノーマルマウス IgG ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) + ヤギ抗ヒト IgG ( $100 \mu\text{g/ml}$ )	0.163 (8%)	0.158 (7%)

20

<sup>a</sup> : 最大結合パーセント

30

【0052】

OC-3-VGH の細胞における CA215 の分泌型及び膜結合型の両方の存在を、以下の表 5、図 6 及び図 7 に示すようにさらに確認した。表 5 は、固定化した OC-3-VGH のホール(whole)細胞、OC-3-VGH の培養培地又は精製抗原の何れかを含む(膜)片を検出剤で処理した場合のウェスタンプロットの結果を示す。[表 5 に]示すように、検出方法にかかわらず、培養培地の場合のように、精製抗原は、分子量 54-55 kD でのみ結果を出した。しかしながら、ホール細胞は、50-56 kD 及び 68-73 kD の両方の分子量で結果を示した。表 5 において、N/A は、「適用不可(not applicable)」を表し、ND は、「実行しない(not done)」を表す。

[表 5]

40

還元条件下の OC-3-VGH の細胞、培養培地及び精製 CA215 の、RP215 及び抗ヒト IgG プローブでのウェスタンプロット

ウェスタンブロット条件		種々の起源のニトロセルロース片から検出されたバンドの分子量 (K D a)		
一次抗体	二次抗体	OC-3-VGH ホール細胞の (膜)片	OC-3-VGH の培養培地の (膜)片	精製CA215の (膜)片
RP215	GAM IgG- ALP	56/68	55	55
MAH IgG	GAM IgG- ALP	55-73 (ブロード)	55	54
MAH IgA- ALP	N/A	50	ND	ND
MAH IgM- ALP	N/A	70	ND	ND

MAH : モノクローナル抗ヒト

GAM : ヤギ抗マウス

【0053】

図6は、OC-3-VGHの細胞に結合するRP215の分画の連続的なPBS洗浄の結果を示す。図6に示すように、5回の連続的な洗浄の後であっても、細胞を結合する分画における認識可能な変化は起こらない。これらの結果は、培養(培地)ではなく、単離したOC-3-VGHの細胞で得た。

【0054】

このことは、OC-3-VGHの細胞又は比較可能な標準的なハイブリドーマの分泌システムの何れかから培養培地を評価する場合に、同様の分泌のパターンが、HRP検出システムを使用して450nmでの吸光度に基づいて得られることを示す、図7における結果と対照的である(相反する)。

【0055】

従って、分泌型及び膜結合型は、同時に生成されかつ異なる分子量を有するように見える。分泌型はおよそ55kDの分子量を有し、膜結合型は、およそ73kDの分子量を有する。

[実施例2]

アフィニティ精製CA215の糖の組成

【0056】

CA215の糖の組成を、Complex Carbohydrate Research Center(Athens, Georgia, USA)による契約サービスを介して解析した。比較のために、ノーマルヒトIgG及びRP215モノクローナル抗体の組成解析も行った。

【0057】

この糖組成解析の比較結果を表6に要約する。グルコースは、主要混入物として同定されたため、正確な測定は容易ではないので、グルコースの値は、決定しなかった。

[表6]

中性(ニュートラル)のアミノ糖組成(グルコースを除く)

10

20

30

40

サンプルID	アミノ/糖のタイプ	nmoles/ $\mu$ g	モル濃度%	
無塩-ヒト IgG	フコース	0.0077	7.93	10
	N-アセチル-ガラクトサミン	0.0068	6.99	
	N-アセチル-グルコサミン	0.0394	40.72	
	ガラクトース	0.0053	5.46	
	グルコース	ND	ND	
	マンノース	0.0376	38.90	
	N-アセチル-ノイラミン酸	0.0000	0.00	
	N-グリコール-ノイラミン酸	0.0000	0.00	
	合計:	0.0967	100.0	
無塩-RP215Ma b	フコース	0.0085	5.03	20
	N-アセチル-ガラクトサミン	0.0000	0.00	
	N-アセチル-グルコサミン	0.0762	45.16	
	ガラクトース	0.0076	4.48	
	グルコース	ND	ND	
	マンノース	0.0765	45.33	
	N-アセチル-ノイラミン酸	0.0000	0.00	
	N-グリコール-ノイラミン酸	0.0000	0.00	
	合計:	0.1688	100.0	
CA215 Lot No. 070305 A	フコース	0.0018	1.10	30
	N-アセチル-ガラクトサミン	0.0154	9.45	
	N-アセチル-グルコサミン	0.0442	27.05	
	ガラクトース	0.0229	14.05	
	グルコース	ND	ND	
	マンノース	0.0789	48.35	
	N-アセチル-ノイラミン酸	0.0000	0.00	
	N-グリコール-ノイラミン酸	0.0000	0.00	
	合計:	0.1633	100.0	
CA215 Lot No. 070305 B	フコース	0.0018	2.46	40
	N-アセチル-ガラクトサミン	0.0095	13.04	
	N-アセチル-グルコサミン	0.0208	28.40	
	ガラクトース	0.0042	5.68	
	グルコース	ND	ND	
	マンノース	0.0369	50.41	
	N-アセチル-ノイラミン酸	0.0000	0.00	
	N-グリコール-ノイラミン酸	0.0000	0.00	
	合計:	0.0731	100.0	

## 【0058】

ヒト Ig は、RP215 (マウス IgG) に無い N-アセチルガラクトサミンを含むが、ノーマルヒト IgG 及び RP215 は、同様の糖組成を有する。CA215 は、ノーマルヒト IgG 又はマウス IgG の何れからも異なる糖の内容を示す。CA215 は、比較的低いパーセンテージの N-アセチルグルコサミン (27 - 28% 対 40 - 45%) を含むが、顕著に比較的高い量のマンノースを含む (48 - 50% 対 38 - 45%)。

## [ 実施例 3 ]

N-結合型及び O-結合型のオリゴ糖の鑑定

## 【0059】

全体的な糖の内容に加え、エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) によって、ヒト IgG、RP215 及び CA215 に関連する N-結合型グリカンの構造を決

定した。

【0060】

この決定を実行する際に、サンプルを1mlのナノピュア水(nanopure water)に溶解した。各々800µLのヒトIgG、RP215mAB、CA215のサンプルB、900µLのCA215のサンプルA、及び全てのCA215のサンプルCをねじ口チューブにピペット注入し、凍結乾燥させた。乾燥させたサンプルを100µLの炭酸水素アンモニウムバッファー(50mM、pH8.4)で溶解し、その直後(トリプシン消化(37、オーバーナイト)する前)に25mMのジチオスレイトールで還元させ(45分間、50)、90mMのヨードアセトアミドでカルボキシアミドメチル化した(45分間、室温、暗所)。各々のトリプシン消化物に第二の酵素(ペプチドN-グリコシダーゼF(New England BioLabs))を加え、37で18時間インキュベートして、N-結合型グリカンを遊離させた。酵素消化の後、サンプルはC18逆相カートリッジ(reversed phase cartridge)を通過させた。各サンプルからのN-結合型グリカンを5%酢酸で溶出し、次に凍結乾燥した。

10

【0061】

各サンプルの凍結乾燥したN-結合型分画をジメチルスルホキシドに溶解し、次に、NaOH及びヨウ化メチルでメチル化させた。反応を水の添加によって停止(ないし抑制)し、ペル-O-メチル化糖(per-O-methylated carbohydrates)をジクロロメタンで抽出した。有機相を乾燥状態まで濃縮し、次にグリカン構造解析のためメタノールで溶解した。

20

【0062】

5つのサンプル全てからのN-結合型グリカンの特性(profiles)を、エレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)によって、LCQ-MS(Thermo Finnigan)四重極イオントラップを使用して解析した。各サンプル(~5pmol/µL)を装置にシリンジポンプ(Harvard Apparatus)を通して1µL/分の一定の流速で直接注入し、3.5kVでスプレーした。規格化した35の衝突エネルギー及び2Daの単離質量窓(isolation mass window)を採用し、MSnを得た。

【0063】

結果を表7~10及び図1~5に示す。明らかにサンプルが小さ過ぎて規定のピークを得ることができなかったため、CA215サンプルCに関して表を提供しない。表9及び10において、ハイライト(網かけ)した部分は、CA215においては見られるがIgG又はRP215においては見られない構造を表す。

30

【0064】

さらに、おそらく低サンプルサイズのため、再度、シアル酸は検出されなかったように見える。

[表7]

ESI-MSによるヒトIgGのN-結合型グリカンの特性(profiles)

検出質量	{M+Na}	チャージ 状態	提唱された構造	構造	
1032		二重 (2つ)	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>1</sub> Fuc <sub>1</sub>		
1134		二重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub>		
1228		二重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub> NeuAc <sub>1</sub>		
1257		二重	GlcNAc <sub>5</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub>		
1315		二重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub>		10
1350		二重	GlcNAc <sub>5</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub> NeuAc <sub>1</sub>		
1408		二重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub> NeuAc <sub>2</sub>		
1437		二重	GlcNAc <sub>5</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub>		
1495		二重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>2</sub>		
1618		二重	GlcNAc <sub>5</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>2</sub>		
1836		一重 (1つ)	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub>		20
1866		一重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>1</sub>		
1907		一重	GlcNAc <sub>5</sub> Man <sub>3</sub>		

説明:

- ⊗ マンノース
- ガラクトース
- ▲ フコース
- N-アセチル-グルコサミン
- ◇ N-アセチル-ノイラミン酸

30

[ 表 8 ]

E S I - M S による R P 2 1 5 M a b の N - 結合型グリカンの特性 (profiles)

検出質量	{M+Na}	チャージ 状態	提唱された構造	構造
1032		二重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>1</sub> Fuc <sub>1</sub>	
1134		二重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub>	
1242		二重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub> NeuGc <sub>1</sub>	
1314		二重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub>	
1453		二重	GlcNAc <sub>5</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuGc <sub>1</sub>	
1417		一重	GlcNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub>	
1663		一重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub>	
1836		一重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub>	
1866		一重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>1</sub>	

10

説明：

- ⊗ マンノース
- ガラクトース
- ▲ フコース
- N-アセチル-グルコサミン
- ◇ N-アセチル-ノイラミン酸
- ◆ N-グリコール-ノイラミン酸

20

[ 表 9 ]

ESI-MSによるCA215サンプルAのN-結合型グリカンの特性 (profiles)

検出質量	{M+Na}	チャージ 状態	提唱された構造	構造	
1047		二重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub>		
1172		一重	GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub>		
1228		二重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub> NeuAc <sub>1</sub>		
1243		二重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub> NeuGc <sub>1</sub>		
1330		二重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuGc <sub>1</sub>		10
1452		二重	GlcNAc <sub>5</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>3</sub> NeuAc <sub>1</sub>		
1467		二重	GlcNAc <sub>5</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>3</sub> NeuGc <sub>1</sub>		
1418		一重	GlcNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub>		
1621		一重	GlcNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>1</sub>		
1663		一重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub>		20
1836		一重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub>		
1866		一重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>1</sub>		
1907		一重	GlcNAc <sub>5</sub> Man <sub>3</sub>		

説明：

- ⊗ マンノース
- ガラクトース
- ▲ フコース
- N-アセチル-グルコサミン
- ◇ N-アセチル-ノイラミン酸
- ◆ N-グリコール-ノイラミン酸

30

[ 表 1 0 ]

E S I - M S による C A 2 1 5 サンプル B の N - 結合型グリカンの特性 ( profiles )

検出質量	{M+Na}	チャージ 状態	提唱された構造	構造	
1047		二重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub>		
1134		二重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub>		
1169		二重	GlcNAc <sub>5</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub>		
1228		二重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub> NeuAc <sub>1</sub>		10
1242		二重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub> NeuGc <sub>1</sub>		
1315		二重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuAc <sub>1</sub>		
1330		二重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuGc <sub>1</sub>		
1366		二重	GlcNAc <sub>5</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub> NeuGc <sub>1</sub>		
1438		二重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub> NeuGc <sub>2</sub>		
1525		二重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Hex <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> NeuGc <sub>2</sub>		20
1580		一重	GlcNAc <sub>5</sub> Man <sub>5</sub>		
1663		一重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub>		
1785		一重	GlcNAc <sub>5</sub> Man <sub>6</sub>		
1837		一重	GlcNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> Fuc <sub>1</sub>		
1907		一重	GlcNAc <sub>5</sub> Man <sub>3</sub>		

説明：

- ⊗ マンノース
- ガラクトース
- ▲ フコース
- N-アセチル-グルコサミン
- ◇ N-アセチル-ノイラミン酸
- ◆ N-グリコール-ノイラミン酸

#### 【 0 0 6 5 】

一般的に、ヒト IgG 及び RP 2 1 5 の両方において、検出された主要なイオンは、グリコシル化構造 (N/Z 1 8 3 6) を有する。これは、CA 2 1 5 のサンプルにおいても検出されたが、シグナルは、ヒト IgG 及び RP 2 1 5 ほど支配的ではなかった。他の

#### 【 0 0 6 6 】

さらに、これらの物質の O - 結合型糖の内容も決定し、結果を表 1 1 に示した。

[ 表 1 1 ]

H P A E C により解析された O - グリカンの単糖の内容

30

40

サンプル名	分析物	nmoles	モル濃度%	
ヒト IgG-シグマ	フコース	0.0702	4.1	
	N-アセチル-ガラクトサミン	0.3360	19.7	
	N-アセチル-グルコサミン	0.7958	46.8	
	ガラクトース	0.3717	21.8	
	グルコース	nd	nd	
	マンノース	nd	nd	
	N-アセチル-ノイラミン酸	0.1276	7.6	
	N-グリコール-ノイラミン酸	nd	nd	10
	合計:	<b>1.7013</b>	<b>100.0</b>	
RP215 Mab # 070801-A	フコース	0.0692	6.2	
	N-アセチル-ガラクトサミン	0.2004	18.1	
	N-アセチル-グルコサミン	0.3569	32.2	
	ガラクトース	0.3475	31.4	
	グルコース	nd	nd	
	マンノース	nd	nd	
	N-アセチル-ノイラミン酸	0.0838	7.6	
	N-グリコール-ノイラミン酸	0.0501	4.5	20
	合計:	<b>1.1079</b>	<b>100.0</b>	
CA215 1 # 070801-1	フコース	0.0981	14.8	
	N-アセチル-ガラクトサミン	0.0961	14.5	
	N-アセチル-グルコサミン	0.1371	20.7	
	ガラクトース	0.1473	22.3	
	グルコース	nd	nd	
	マンノース	nd	nd	
	N-アセチル-ノイラミン酸	0.1320	20.0	
	N-グリコール-ノイラミン酸	0.0508	7.7	30
	合計:	<b>0.6614</b>	<b>100.0</b>	

サンプル名	分析物	nmoles	モル濃度%	
CA215 4 # 070801-4	フコース	nd	nd	
	N-アセチル-ガラクトサミン	nd	nd	
	N-アセチル-グルコサミン	nd	nd	
	ガラクトース	nd	nd	
	グルコース	nd	nd	
	マンノース	nd	nd	
	N-アセチル-ノイラミン酸	0.3512	100.0	10
	N-グリコール-ノイラミン酸	nd	nd	
	合計:	<b>0.3512</b>	<b>100.0</b>	
CA215 5 # 070801-5	フコース	nd	nd	
	N-アセチル-ガラクトサミン	0.4961	34.2	
	N-アセチル-グルコサミン	0.3506	24.2	
	ガラクトース	0.3539	24.4	
	グルコース	nd	nd	
	マンノース	nd	nd	
	N-アセチル-ノイラミン酸	0.2307	15.9	20
	N-グリコール-ノイラミン酸	0.0198	1.3	
	合計:	<b>1.4511</b>	<b>100.0</b>	

nd = 非検出 (not detected)

#### [ 実施例 4 ]

##### 糖エピトープの位置

【 0 0 6 7 】

ウェスタンブロットを使用して、RP215 特異的糖関連ピトープが癌細胞由来のCA215のIg重鎖のFab領域に位置することを示してきた。いくつかの免疫グロブリン重鎖のCDR1、CDR2及びCDR3領域のアミノ酸(解析)を解析し、糖鎖付加(ないしグルコシル化)部分(の位置)を位置づけした。表12において、これらの比較結果を示す。

[ 表 1 2 ]

30

40

細胞系統 又は組織	FR1にお ける最後 の6つの アミノ酸	CDR1	CDR2	CDR3	
T47D	SRFSSR	TSGMR	PFWNGGSQKYCADSVT	GITVPBPRLCPRN	IgG
ZR75-1	SGYSFT	SYWIG	IIYPGDS DTRYSPSFQG	QBIVAFS	IgM
ZR75-1	SGFNFN	TYAMT	TIAADGTWTSNADFVRG	DWYDY	IgG
SKBR3	SGGSVS	SGYYYWS	YIYYNGSTYENPSLKS	DIKHTYGN	IgG
SKBR3	SGLSFS	SSGMN	RIGSKAASDTT SYAASVRG	QGCGGDCHIPKM	IgA
MDA-MB-231	SGFTFS	SYWMD	RISPDGRTTTYADSVEG	GYLSSH	IgM
肺癌	SGYTFG	TYWIG	IIYPGDS DTTYSPSFRG	WDVMIGFYTA	
Dakiki	SGFTFS	DYGMT	GITSSVLTTYADSVKG	AQGFAPPAS	
IM-9	SGFRFD	DYAMH	GISWNSDTIDYADSVKG	TKEGGVTDIDPFDI	
MC116	SGYRFT	GYYMH	RINPNSGGINYAQRFG	TREDSGSY EY	
Daudi	SGYSIT	SYYIH	KTDNDGRDADYAQRFG	VRENGQKCFDY	

10

## 【 0 0 6 8 】

セリン又はスレオニンを有する定常性のO-結合型糖鎖付加部分は、常にFR1及びCDR1の間の接合部の近くに位置し、従ってRP215特異的エピトープは、この位置(部分)におけるセリン又はスレオニン残基の存在に関連することが指し示された。このO-糖鎖付加部分の欠如は、RP215がCA215を認識できないという結果になる。

20

## [ 実施例 5 ]

## インビボのRP215の有効性

## 【 0 0 6 9 】

OC-3-VGHの卵巣癌細胞の培養細胞へのRP215モノクローナル抗体の添加は、成長に対する影響を有さないが、これらの抗体は、インビボにおいて腫瘍の成長を阻害することに成功した。培養細胞の成長は、インビトロにおいても、ヒトIgG又はヤギ抗ヒトIgGの何れによっても細胞培養(液)中200µg/mlの濃度まで阻害されなかった。

30

## 【 0 0 7 0 】

生後2~3週間の(ないし2~3週間の成長期間の)4つのヌード(nude)マウスの各グループに、胸に近い部分において、 $2 \times 10^6$ 細胞/マウス(0.2ml中)で皮下に移植した。目に見える明らかな腫瘍の成長の後に、処置を行った。表13に実験計画を示す。放射線標識のmAb(モノクローナル抗体)は、 $12.5 \mu\text{Ci}/\text{mg}$ の特異的な放射活性であった。

## [ 表 1 3 ]

実験 No.	グループ No.	実験動物 (n)	投与量
1.	ネガティブコントロール	4	培地(溶媒)のみ
2.	ポジティブコントロール	4	シクロホスホンアミド(60mg/Kg)
3.	抗体(高投与量)(非標識(naked))	4	RP215Mab (10mg/Kg)
4.	抗体(低投与量)(非標識)	4	RP215Mab (2mg/Kg)
5.	$I^{131}$ 標識抗体 (高投与量)	4	RP215Mab (10mg/Kg+125µCi)
6.	$I^{131}$ 標識抗体	4	RP215Mab (6mg/Kg+75µCi)
7.	$I^{131}$ 標識抗体	4	RP215Mab (2mg/Kg+25µCi)

40

## 【 0 0 7 1 】

抗体を処置した後、16日目にマウスを屠殺(ないし解剖)し、体重を決定するととも

50

に、各マウスにおける腫瘍の大きさを重量によって決定した。これらの結果を表 1 4 に示す。

[ 表 1 4 ]

グループID	マウス #	体重	腫瘍の重量	腫瘍の重量の平均	パーセント
ネガティブコントロール	1	22.23	0.148	0.13075	100
	2	22.51	0.133		
	3	23.16	0.104		
	4	21.14	0.138		
ポジティブコントロール (シクロホスホンアミド 60mg/Kg)	1	21.18	0.098	0.09575	73.2
	2	21.42	0.096		
	3	23.37	0.098		
	4	21.18	0.091		
抗体 (高投与量10mg/Kg)	1	21.43	0.088	0.0865	66.2
	2	23.05	0.077		
	3	22.15	0.095		
	4	23.56	0.086		
抗体 (低投与量2mg/Kg)	1	21.76	0.103	0.10225	78.2
	2	20.57	0.122		
	3	21.98	0.080		
	4	22.64	0.104		
I <sup>131</sup> 標識抗体 (高投与量10mg/Kg)	1	20.26	0.034	0.4575	35
	2	25.71	0.075		
	3	20.25	0.048		
	4	22.60	0.026		
I <sup>131</sup> 標識抗体 (中投与量6mg/Kg)	1	20.47	0.068	0.0705	53.9
	2	22.91	0.076		
	3	23.00	0.049		
	4	23.05	0.089		
I <sup>131</sup> 標識抗体 (低投与量2mg/Kg)	1	20.03	0.154	0.11675	89.2
	2	21.46	0.083		
	3	22.12	0.108		
	4	20.38	0.122		

【 0 0 7 2 】

[ 表 1 4 に ] 示すように、放射線同位体標識なしの 1 0 m g / k g で投与された抗体は、6 0 m g / k g のシクロホスホンアミドが採用されたポジティブコントロールよりも顕著に腫瘍の大きさを減少させた。同じ投与量の I<sup>131</sup> 標識抗体は、さらに腫瘍の大きさを減少させた。

[ 実施例 6 ]

R P 2 1 5 の可変領域のヌクレオチドシーケンス

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 3 】

R P 2 1 5 をヒト化 (humanizing) する目的のため、そして、突然変異誘発の標的として、C A 2 1 5 に対する好ましい免疫反応性の性質を有する更なる抗体を得るように、R P 2 1 5 の重鎖及び軽鎖の可変部分をエンコードするヌクレオチドシーケンスを決定し、[そのヌクレオチドシーケンスを] 論理的に導出されるアミノ酸シーケンスに沿って表 1 5 に示す。

[ 表 1 5 ]

領域	長さ (b p)	ヌクレオチドシーケンス	
H鎖可変領域 シグナルペプチド	— 19アミノ酸	1 atgagatggagctgtatcatcctcttcttggtagcaacagctacaggtgtcagctcc M R W S C I I L F L V A T A T G V S S	
H鎖可変領域 112アミノ酸		1 caggtccaactgcagcagcctggggctgagcttgtgatc Q V Q L Q Q P G A E L V M 46 gcttcagtgaagatgtcctgcaaggcttctggctacaca A S V K M S C K A S G Y T 91 gactactggatgcaactgggtgaagcagaggcctggacae D Y W M H W V K Q R P G Q 136 gagtggatcggagcgttgatacttctgatagttatact E W I G A I D T S D S Y T 181 aatcaaaagttcaaggacaaggccacattgactgtagac N Q K F K D K A T L T V D 226 tccagcacagccttcatgcagctcagcagcctgacatct S S T A F M Q L S S L T S 271 tctgcggtctattactgtgcaagatccatctatgactgg S A V Y Y C A R S I Y D W 316 gggactctggtcactgtctctgca 339 G T L V T V S A	10 20
L鎖可変領域 —シグナルペプチド		1 atggaatcacagacccaggtcctcatgtttcttctgctc M E S Q T Q V L M F L L L 46 tctgggtggtgcctgtgca 63 S G G A C A	
L鎖可変領域 112アミノ酸		1 gacattgtgatgacacagtctccatcctccctggctatg D I V M T Q S P S S L A M 46 ggacagaaggtcactatgagctgcaagtccagtcagagc G Q K V T M S C K S S Q S 91 aatagtagcaatcaaaagagctatctggcctgggtaccac N S S N Q K S Y L A W Y Q 136 ccaggacagtctcctaaacttctgggtatactttgcatcc P G Q S P K L L V Y F A S 181 gaatctggggctccctgatcgttccataggcagtggtatc E S G V P D R F I G S G S 226 gatttcactcttaccatcagcagtggtcaggctgaagac D F T L T I S S V Q A E D 271 gattacttctgtcagcaacattatagcactccgtccacc D Y F C Q Q H Y S T P S T 316 ggggggaccaagctggaaataaaa 339 G G T K L E I K	30 40

RP215モノクローナル抗体の可変領域のヌクレオチド及び導出されるアミノ酸シ  
【0074】

この情報を使用して、CA215と免疫反応性のモノクローナル抗体の代替的形態（C  
A215のヒト化形態を含む）を設計し、生成した。

## R P 2 1 5 のヒト化

## 【 0 0 7 5 】

実施例 6 に提示の情報を使用して、R P 2 1 5 のヒト化形態 ( h R P 2 1 5 ) を調製した。

## 【 0 0 7 6 】

さらに、同様のヒトの定常領域及び実施例 6 に上記提示のマウスの可変領域を使用して、キメラの R P 2 1 5 m A b ( c h R P 2 1 5 ) を調製した。

## 【 0 0 7 7 】

R P 2 1 5、H R P 2 1 5 及び c h R P 2 1 5 を、精製形態で取得し、以下に記載のように比較した。

## 【 0 0 7 8 】

各々 [ の抗体 ] を、別々に 5  $\mu$  g / m l でオーバーナイトで、マイクロウェルにコートした。マイクロウェルを O C - 3 - V G H の細胞 ( C A 2 1 5 を供給する ) の濃縮細胞培養液の培地上澄 ( shed medium ) で処理し、次に、検出抗体としての H R P 標識 R P 2 1 5 で処理した。検出抗体を、各ウェルで、60 分間、37  $^{\circ}$  でインキュベートした。30 分後、カラー現像用の T M B 基質を 20 分間加え、そして、反応を停止した後、E L I S A リーダーにおいて 450 n m で強度 ( intensity ) を決定した。いくつかのケースにおいて、10  $\mu$  g / m l のヒト I g G をウェルに加えたが、これは、シグナル強度に対する明らかな影響を有さなかった。結果を表 16 に示す。

## [ 表 1 6 ]

コートした抗体	サンドイッチ E I A における 相対的なシグナル強度 (ヒト I g G 無し)	サンドイッチ E I A における 相対的なシグナル強度 (10 $\mu$ g/ml のヒト I g G)
RP215	100%	100%
hRP215	20.6%	21.4%
chRP215	14.5%	15.4%

## 【 0 0 7 9 】

[ 表 1 6 に ] 示すように、h R P 2 1 5 及び c h R P 2 1 5 は、( より ) 低い結合親和性を示したが、それにもかかわらず、C A 2 1 5 に特異的に結合することができ、ヒト I g G によって影響されなかった。

## 【 0 0 8 0 】

更なる実験において、R P 2 1 5 でコートしたマイクロウェルは、アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒト I g G 又はこの抗体の F a b 又は F c 領域の結合を示さなかった。しかしながら、R P 2 1 5 は、ヤギ抗マウス I g G の強力な結合を示した。

## 【 0 0 8 1 】

H R P 2 1 5 は、ヤギ抗マウス I g G に対する結合をほとんど示さない、あるいは全く示さなかったが、ヤギ抗ヒト I g G に対する強力な結合を示した。結果は、c h R P 2 1 5 と同様であった。

## 【 0 0 8 2 】

これらの結果を表 17 に示す。

## [ 表 1 7 ]

使用された 検出抗体	ウェル内にコートされた抗体			
	RP215	hRP215 の相対的強度	chRP215 の相対的強度	hIgGの 相対的強度
ヤギ抗マウス IgG <sup>a</sup>	100%	~5%	~7%	~3%
ヤギ抗ヒト IgG <sup>a</sup>	<0.5%	100%	~10%	70%
ヤギ抗ヒト IgFc	<0.5%	150%	45%	100%
ヤギ抗ヒト IgFab	<1%	70%	10%	40%

10

a : ヤギ抗マウス Ig G 及びヤギ抗ヒト Ig G に関するシグナル強度は、比較目的のために 100% に調節した。

## 【0083】

表 17 に示すように、ウェルを、RP215、ヒト RP215 (hRP215)、キメラヒト RP215 (chRP215) 又はヒト Ig G の何れかでコートした。第 1 行において、RP215 及びヤギ抗マウス Ig G 間の相互作用について、結果を 100% に規格化した。第 1 行において示されるように、ヤギ抗マウス Ig G は、ヒト化形態又はキメラのヒト化形態に比べて、貧弱に結合した。

## 【0084】

20

第 2 行において、ヤギ抗ヒト Ig G が検出因子として使用され、ヒト化 RP215 (hRP215) を 100% に据えた (規格化した) とき、ヒト Ig G に関しては減少した結合を示し、そして、キメラ又はマウスの RP215 に関して非常に減少した結合を示した。

## 【0085】

第 3 行において、検出抗体がヤギ抗ヒト Ig Fc であったとき、強力な結合がヒト化 RP215 及びヒト Ig G に対して示されたが、減少した結合がキメラのヒト RP215 に対して示され、RP215 それ自体に対しては実質的に結合が示されなかった。

## 【0086】

第 4 行において、ヤギ抗ヒト Ig Fab が使用されたとき、ヒト化 RP215 において強力な結合が検出されたが、相対的に貧弱なヒト Ig G の結合が検出され、そして RP215 及びキメラの RP215 について、予測ないし期待されたように、非常に弱い結合が検出された。

30

## 【0087】

このことから、以下のことが結論付けられる：

(1) ヒト化抗体 (hRP215) 及びキメラの抗体 (chRP215) は、ヤギ抗ヒト Ig G に対する交差反応性と比較可能な (comparable) ほど低い交差反応性をヤギ抗マウス Ig G に対して示した。

(2) hRP215 及び chRP215 の両方は、マウス起源の [抗体] である RP215 の非常に弱い結合 [すなわち、ヤギ抗ヒト Ig Fc 抗体の RP215 に対する結合] に比べて、ヒト Ig G の結合活性と同じような高い結合活性をヤギ抗ヒト Ig Fc 抗体に対して示した。chRP215 は、これに対して、非常に低い結合活性をヤギ抗ヒト Ig Fab に対して有する。

40

## 【0088】

これらの結果は、ヒト化抗体が CA215 に対する抗原結合特異性を保持し、かつマウスの特徴を排除したヒトの特徴を有することを示す。

## [実施例 8]

CA215 の存在に関する癌細胞系統 (株) の解析

## 【0089】

50

A T C C 及びその他からの 30 を上回る癌細胞系統 (株) における R P 2 1 5 特異的エピトープ (1 以上) の存在は、ウェスタンブロットアッセイ及びサンドイッチ E I A を使用してテストされてきた。以下の癌細胞系統は、癌細胞抽出物における、そして細胞を培養した培地上澄における R P 2 1 5 関連エピトープの存在に関してポジティブであることが示された (> 90%)。

乳癌細胞系統 :

MCF7 (HTB-22)、MDA-MB-231 (HTB-26)、MDA-MB-468(HTB-132)、MDA-435、SW-48(CCL-231)、T-47D (HTB-133)

10

子宮頸癌細胞系統 :

C-33A(HTB-31)、ME-180(HTB-33)

結腸癌 (ないし大腸癌) 細胞系統 :

HCT115(ABM)、HCT116 (CCL-247)、HT29 (HTB-38)

肝臓癌細胞系統 :

Hep3B(HB-8064)、HepG2 (HB-8065)、Hep-2 (CCL-23)

腎臓癌細胞系統 :

293(UBC)

20

肺癌細胞系統 :

A549(CCL-185)、Calu-6(HTB-56)、H441(HTB-174)、MRC-5(CCL-171)、WI-38 (CCL-75)

リンパ腫

HEL(ABM)

メラノーマ :

MMAN、MMRU、SK-Mel-3 (HTB-69)

30

神経芽細胞腫 :

SH-SY5Y(CRL-2266)、Neuro2A(CCL-131)

骨癌細胞系統 :

U-20S (HTB-96)

卵巣癌細胞系統 :

Skov-3(HTB-77)、OC-3-VGH(台湾)

40

前立腺癌細胞系統 :

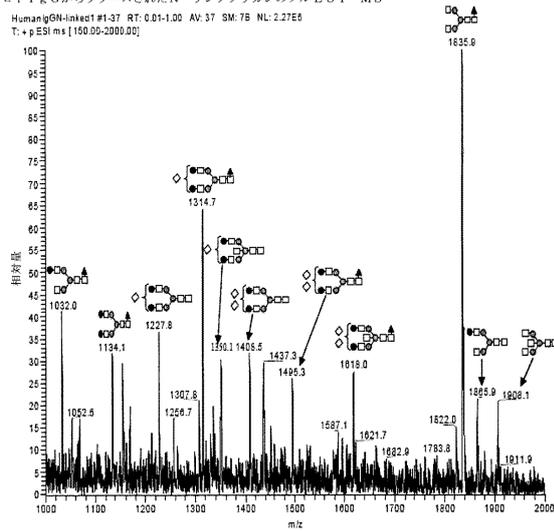
DU145(HTB-81)、PC-3 (CRL-1435)

**【 0 0 9 0 】**

しかしながら、いくつかの癌細胞系統において、R P 2 1 5 特異的エピトープの存在は、容易に示すことができない。それらは、SiHa(HTB-35、(子宮)頸)、JEG-3 (HTB-36、胎盤)、Jurkat(TIB-152、T - 細胞白血病)である。

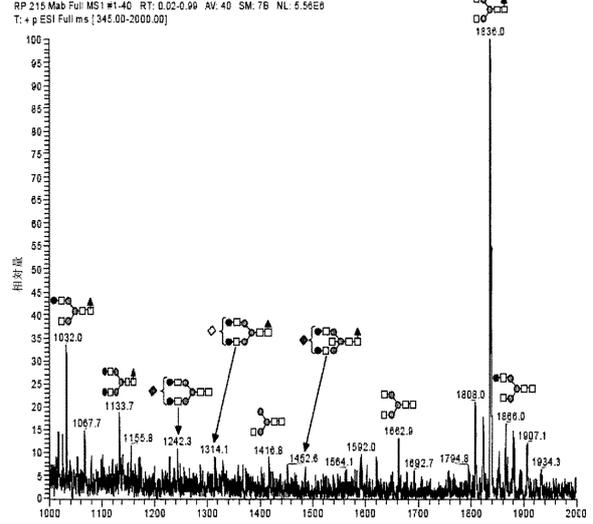
【図 1】

ヒト I R G からリリースされた N-リンクグリカンのフル ESI-MS  
Human IgG-linked #1-37 RT: 0.01-1.00 AV: 37 SM: 7B NL: 2.27E6  
T: +p ESI ms [150.00-2000.00]



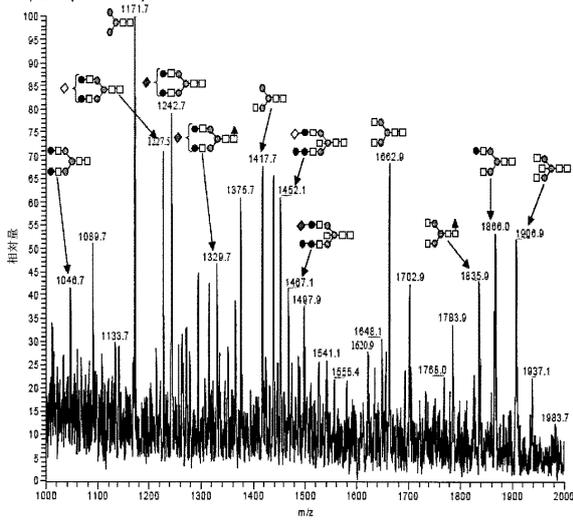
【図 2】

RP 215 Mab からリリースされた N-リンクグリカンのフル ESI-MS  
RP 215 Mab Full MS1 #1-40 RT: 0.02-0.99 AV: 40 SM: 7B NL: 5.56E6  
T: +p ESI Full ms [345.00-2000.00]



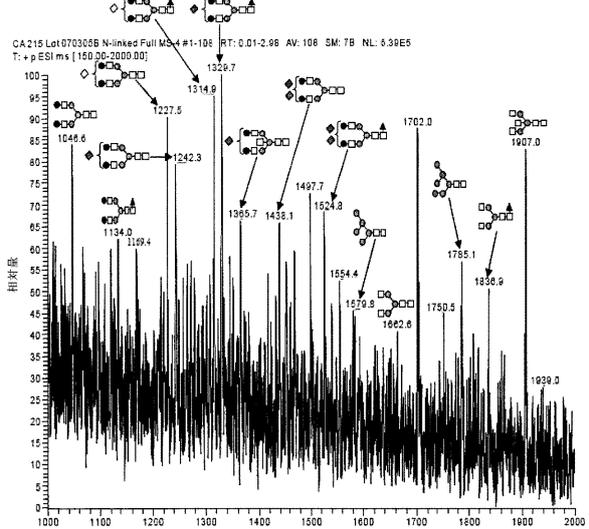
【図 3】

CA 215 サンプルからリリースされた N-リンクグリカンのフル ESI-MS  
CA 215 Lot 070305A N-linked Full MS-3 #1-131 RT: 0.01-2.98 AV: 131 SM: 7B NL: 1.02E6  
T: +p ESI ms [525.00-2000.00]



【図 4】

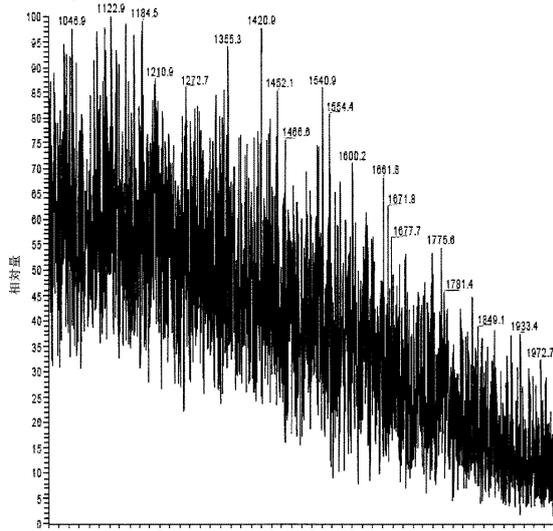
CA 215 サンプルからリリースされた N-リンクグリカンのフル ESI-MS  
CA 215 Lot 070305B N-linked Full MS-4 #1-105 RT: 0.01-2.98 AV: 105 SM: 7B NL: 6.39E5  
T: +p ESI ms [150.00-2000.00]



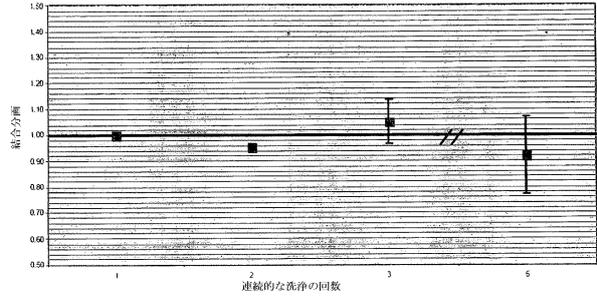
【 5 】

CA215サンプルからリリースされたN-リンク糖リガンのフルESI-MS

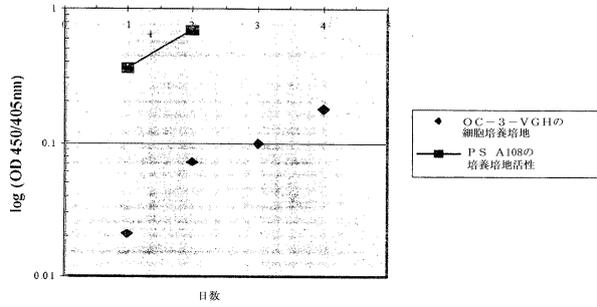
CA215 Let070305C N-linked Full MS-3 #1-125 RT:0.D1-2.99 AV: 125 SM: 78 NL: 7.58E5  
T: +pESI ms [430.00-2000.00]



【 6 】



【 7 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

(56)参考文献 米国特許第 0 5 6 5 0 2 9 1 ( U S , A )  
J. Clin. Lig. Assay , 2 0 0 6 年 , vol.29, no.1 , pp.47-51  
Cancer Immunol. Immunother. , 1 9 9 2 年 , vol.35, no.1 , pp.19-26  
Int. J. Gynecol. Obstet. , 1 9 9 5 年 , vol.49, suppl. , pp.S27-S32

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)  
C 0 7 K 1 4 / 4 3 5 - 1 4 / 7 9  
C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6  
G 0 1 N 3 3 / 5 3 - 3 3 / 5 7 7  
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S /  
W P I D S ( S T N )  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
P u b M e d