(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3683270号
(P3683270)
(45)発行日　平成17年8月17日(2005.8.17)　(24)登録日　平成17年6月3日(2005.6.3)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
C12N 15/02	C12N	15/00	C
C07K 16/40	C07K	16/40	
C12N 5/10	G01N	33/50	T
G01N 33/50	G01N	33/534	
G01N 33/534	G01N	33/573	A

請求項の数 17　(全 23 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平7-524988
(86)(22)出願日　平成7年3月29日(1995.3.29)
(65)公表番号　特表平9-511141
(43)公表日　平成9年11月11日(1997.11.11)
(86)国際出願番号　PCT/FI1995/000170
(87)国際公開番号　WO1995/026364
(87)国際公開日　平成7年10月5日(1995.10.5)
審査請求日　平成14年3月27日(2002.3.27)
(31)優先権主張番号　220,240
(32)優先日　平成6年3月29日(1994.3.29)
(33)優先権主張国　米国(US)

微生物の受託番号　DSM　ACC2159

(73)特許権者
リセンチア　リミテッド
フィンランド共和国、フィン-００１３０
ヘルシンキ、エロッタヤンカツ　１９
ベー　５
(74)代理人
弁理士　朝日奈　宗太
(74)代理人
弁理士　佐木　啓二
(74)代理人
弁理士　秋山　文男
(74)代理人
弁理士　田中　弘

最終頁に続く

(54)【発明の名称】受容体Ｔｉｅを認識するモノクローナル抗体およびそれらの用途

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

受容体チロシンキナーゼであるＴｉｅに対するモノクローナル抗体であって、該抗体がＤＳＭ受託番号ＡＣＣ２１５９として寄託されているハイブリドーマ細胞系によって産生された抗Ｔｉｅモノクローナル抗体３Ｃ４Ｃ７Ｇ６である抗体。

【請求項２】

請求の範囲第１項記載のモノクローナル抗体を産生する、ＤＳＭ受託番号ＡＣＣ２１５９として寄託されているハイブリドーマ細胞系。

【請求項３】

検出しうるように標識した請求の範囲第１項記載のモノクローナル抗体。

【請求項４】

検出しうる標識が放射性同位体、蛍光色素、色素、酵素およびビオチンからなる群より選ばれる請求の範囲第３項記載の検出しうるように標識したモノクローナル抗体。

【請求項５】

請求の範囲第１項記載のモノクローナル抗体のマウスのＬ鎖およびＨ鎖の相補性決定領域がヒトの可変領域と融合され、かつ該マウスの相補性決定領域のコンホメーションが保存されているヒト化モノクローナル抗体。

【請求項６】

細胞傷害剤、細胞増殖抑制薬および糖タンパク質からなる群の１つと接合した請求の範囲第１項記載のモノクローナル抗体。

【請求項７】
細胞傷害剤、細胞増殖抑制薬および糖タンパク質からなる群の１つと接合した請求の範囲第５項記載のヒト化モノクローナル抗体。
【請求項８】
生物学的サンプル中のＴｉｅを検出する方法であって、
ａ）Ｔｉｅを含んでいる疑いのあるサンプルを、検出しうるように標識した請求の範囲第１項記載のモノクローナル抗体にさらす工程、
ｂ）該サンプルを洗浄する工程、および
ｃ）該サンプル中の該検出しうるように標識した抗体の存在を検出する工程からなる方法。
【請求項９】
生物学的サンプルが血液細胞または組織細胞を含む溶液および固体組織標本からなる群より選ばれる請求の範囲第８項記載の方法。
【請求項１０】
細胞が白血病細胞および骨髄細胞からなる群より選ばれる請求の範囲第９項記載の方法。
【請求項１１】
生物学的サンプルが内皮細胞の増殖によって特徴づけられる疾患を有する疑いのある患者から採取された組織サンプルである請求の範囲第８項記載の方法。
【請求項１２】
疾患が白血病などの腫瘍性疾患または腫瘍脈管形成を含む疾患、創傷治癒、血栓塞栓性疾患、アテローム性動脈硬化症および炎症性疾患からなる群より選ばれる請求の範囲第１１項記載の方法。
【請求項１３】
疾患が巨核芽球性白血球、神経膠腫、髄膜腫、転移性黒色腫、血管芽腫および血管周囲細胞腫からなる群より選ばれる請求の範囲第１２項記載の方法。
【請求項１４】
検出しうるように標識した請求の範囲第１項記載のモノクローナル抗体からなる生物中の新生血管形成を映像化するための試薬。
【請求項１５】
標識した抗体がテクネチウム９９ｍで標識されている請求の範囲第１４項記載の試薬。
【請求項１６】
検出が、ガンマカメラによって、または単一光子発光コンピュータ連動断層撮影法（ＳＰＥＣＴ）を用いて行なわれる請求の範囲第１４項または第１５項記載の試薬。
【請求項１７】
検出工程がサンドイッチ型分析方法によって行なわれる請求の範囲第８項記載の方法。
【発明の詳細な説明】
技術分野
本発明は概して、様々な内皮細胞およびある腫瘍細胞群において見出される受容体でありチロシンキナーゼであるＴｉｅと反応する抗体に関する。さらに本発明は、前記抗体を作製する方法および前記抗体の使用方法に関する。とくに本発明は、特定の造血細胞ならびに血液学および脈管形成に関連した状態を検出するための診断具として、血管を映像化する道具ならびに治療剤としての抗Ｔｉｅモノクローナル抗体に関する。
背景技術
心臓血管の疾患および癌は西洋の国々において非常に一般的なものであり、これらの疾患をもつ患者は典型的に仕事を離れ、長期間治療を受ける必要があるので、これらの疾患群は経済的に重要である。血管は癌の病因においてばかりでなく、心臓血管の疾患の進行においても重要な役割を果たしている。脈管の疾患の病因における中心的な役割は、血管の内壁に並ぶ内皮細胞によって果たされている。内皮細胞における損傷および代謝障害はいわゆるアテローム斑（atheroma plaques）、さらにはアテローム性動脈硬化症を引きおこす。内皮細胞を刺激する成長因子を介して腫瘍細胞により誘導される新生血管形成は様々

な癌における重要な出来事である。実験研究により、癌のコロニーを発達させ成長させるために、成長している組織へ栄養および酸素を運ぶことを保証する新生血管形成が細胞には必要であることが知られている。

分化した細胞および組織の発達、維持および修復を担う細胞の挙動は大部分、成長因子および類似したリガンドならびにそれらの受容体を経て伝達される細胞間シグナルによって調節されている。受容体は応答細胞（responding cells）の表面に位置し、ほかのホルモン様リガンドだけでなく、ペプチド性成長因子またはポリペプチド性成長因子と結合する。この相互作用の結果、急速かつ長期間の細胞の遺伝子発現の再調整を導く、応答細胞における急速な生化学的変化がおこる。様々な細胞表面につくいくつかの受容体は特定の成長因子と結合しうる。

チロシンのリン酸化は、形質膜を横切るシグナル伝達の重要な様式（key modes）の１つである。現在知られているいくつかの蛋白質チロシンキナーゼ遺伝子は、たとえば上皮細胞成長因子（ＥＧＦ）、インスリン、インスリン様成長因子（ＩＧＦ－Ｉ）、血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ－ＡＡ、ＡＢおよびＢＢ）および繊維芽細胞成長因子（ＦＧＦｓ）などのポリペプチド性成長因子およびホルモンに対するトランスメンブレン受容体（transmembrane receptor）をコードしている。たとえば、ヘルディン（Heldin）およびウエスターマーク（Westermark）、セル・レギュレーション（Cell Reg.）、第１巻、５５５～５５６頁（１９９０年）、ならびにウルリッチ（Ullrich）およびシュレシンガー（Schlessinger）、セル（Cell）、第６１巻、２２４３～３５４頁（１９９０年）参照。内皮細胞の成長因子受容体は、いくつかの重要な生理学的および病理学的過程、すなわち脈管形成、アテローム性動脈硬化症および炎症性の疾患にたとえばＦＧＦ類などの成長因子が関与している可能性があるので、とくに興味深い（フォークマン（Folkman）およびクラグスブルン（Klagsbrun）、サイエンス（Science）、第２３５巻、４４２～４４７頁（１９８７年））。また、いくつかの造血細胞成長因子（hematopoietic growth factor）の受容体はチロシンキナーゼである。これらはコロニー刺激因子１受容体（シェル（Sherr）ら、セル、第４１巻、６６５～６７６頁（１９８５年））および幹細胞因子受容体（stem cell factor receptor）であるｃキット（c-kit）（ヒュアング（Huang）ら、セル、第６３巻、２２５～２３３頁（１９９０年））を含んでいる。

受容体チロシンキナーゼは、構造の類似および差異にもとづき進化論的なサブファミリーに分けることができる。これらの蛋白質はこれらの特異性および親和性において異なる。（前記ウルリッチおよびシュレシンガーの文献。）一般的に、受容体チロシンキナーゼは、糖蛋白質であり、成長因子と結合する能力を有する細胞外ドメイン、通常は蛋白質のαヘリックス部分（alpha-helical portion）であるトランスメンブレン・ドメイン（transmembrane domain）、受容体がたとえば蛋白質のリン酸化により調節されてもよいジャクスタメンブレン・ドメイン（juxtamembrane domain）、受容体の酵素的酵素要素（enzymatic component）であるチロシンキナーゼドメイン、多くの受容体において、受容体に特異的な基質の認識および結合に関係するカルボキシターミナルテール（carboxyterminal tail）から構成される。

最近になって、Ｔｉｅと名づけられた新規な内皮細胞の受容体であるチロシンキナーゼが国際公開第９３／１４１２４号パンフレット（１９９３年）に記載されている。Ｔｉｅは免疫グロブリン様ドメインおよびＥＧＦ様ドメインを含有するチロシンキナーゼ（Tyrosine kinase containing Immunoglobulin- and EGF-like domains）に対応する頭字語である。Ｔｉｅは、たとえば腫瘍脈管形成を含む腫瘍性疾患、創傷治癒、血栓性疾患（thromboembolic diseases）、アテローム性動脈硬化症および炎症性疾患などの内皮細胞および結合している受容体Ｔｉｅが関与する特定の疾患の診断および治療において有用であると考えられている。

本発明者らは、内皮細胞受容体チロシンキナーゼであるＴｉｅの細胞外部分に対するモノクローナル抗体を生成した。これらのモノクローナル抗体は、細胞培養物中のＴｉｅの検出およびインビボでの免疫組織学的試験に使用されている。その結果は、Ｔｉｅの細胞外部分を特異的に認識する抗体は、組織サンプルおよび生物の造血細胞および内皮細胞の監

視（monitoring）および様々な型の癌性腫瘍の診断に使用することができることを示している。

【図面の簡単な説明】

図１はＴｉｅに対する免疫蛍光検査法およびフローサイトメトリーによるＭＯＬＴ－４およびＨＥＬ細胞の分析結果を表わす。

図２はヒト血液細胞におけるＴｉｅのイムノペルオキシダーゼ染色（immunoperoxidase staining）を示す。

図３は８日間経過した創傷を有するマウスにおいて選ばれた標的組織への^{125}Iで標識したモノクローナル抗体３Ｃ４Ｃ７Ｇ６の生体内分布（biodistribution）を示す。

図４は正常の脳、膠芽腫多形（glioblastoma multiforme）および黒色腫転移（melanoma metastasis）におけるＴｉｅの免疫組織化学的染色を示す。目盛は０．０５ｍｍである。

図５はＴｉｅおよび内皮細胞特異的マーカーとしてｖＷＦまたはＣＤ４４を用いた血管芽腫および血管周囲細胞腫の免疫組織化学的染色を示す（４０Ｘ）。

図６は、４８、７２、９６および１２０時間後（それぞれＮ＝３、３、３および４である）の主要臓器における抗ＴＩＥ抗体１０Ｆ１１の分布（％ＩＤ／ｇ）を示す。

図７は６、２４、４８、７２、９６および１２０時間後（それぞれＮ＝３、３、７、２および２である）の主要臓器における抗ＴＩＥ抗体３ｃ４の分布（％ＩＤ／ｇ）を示す。

図８は抗体１０Ｆ１１を用いての４８、９６および１２０時間後の放射能の蓄積ならびに抗体３ｃ４を用いての６、２４、４８、９６および１２０時間後の放射能の蓄積を示す。

図９は被覆された抗体／標識された抗体の４つの異なる対の標準曲線（standard curve）を示す。

図１０は乳癌（breast cancer）（Ｎ＝２）、卵巣癌（Ｎ＝５）およびスモール・セル・ラング・キャンサー（small cell lung cancer）（Ｎ＝６）患者の血清サンプル中における個々のＴｉｅ抗原濃度（μｇ／ｌ）を示す。参考のためのサンプル（Ｎ＝２０）は非癌患者である。

発明の詳細な説明

本発明の目的は、組織サンプルおよび生物全体において造血細胞および内皮細胞を監視する診断方法を提供することである。本発明のさらなる目的は、内皮細胞の状態（損傷、成長など）を描く臨床的検出方法ならびに内皮細胞および生物中の脈管の成長を検出する方法を提供することである。本発明はＴｉｅを認識する抗体を提供する。好ましい態様において、本発明の抗体はＴｉｅの細胞外部分に対して向けられる。

また、ある好ましい態様において、本発明は受容体Ｔｉｅの細胞外部分の異なるエピトープを特異的に認識するモノクローナル抗体を提供する。さらに詳しくは、本発明は３Ｃ４Ｃ７Ｇ６および１０Ｆ１１Ｇ６と名づけられたモノクローナル抗体を提供する。モノクローナル抗体３Ｃ４Ｃ７Ｇ６を産生するハイブリドーマ細胞系はブダペスト条約の規定によりドイチェ・ザンルング・フォン・ミクロオルガニズメン・ウント・ツェルクルツレン・ゲーエムベーハー（Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH）（ＤＳＭ）に寄託されている（ＤＳＭ受託番号ＡＣＣ２１５９）。

検出しうるマーカーで標識されたモノクローナル抗体も提供される。本明細書で使用するとき、「検出しうるマーカー」という用語は当業者に知られているあらゆる検出しうるマーカーを含んでいる。しかしながら、本発明の好ましい態様において、検出しうるマーカーは放射性同位体、蛍光色素、色素、酵素およびビチオンからなる群より選ばれる。本発明の目的に対して、適当な放射性同位体は^{125}Ｉおよび^{131}Ｉを含むがこれらに限定されるものではない。

本発明はまた映像化しうる試薬（imageable agent）に接合（conjugate）したモノクローナル抗体も提供する。本明細書で使用するとき、「映像化しうる試薬」という用語は放射性同位体を含むが、これに限定されるものではない。好ましい放射性同位体はテクネチウム９９ｍである。

さらに本発明は、新生血管が形成されているヒト組織の検出および同定方法を提供する。前記方法は、

（ａ）新生血管が形成されている疑いのある組織および／または体液サンプルをうる工程、
（ｂ）前記サンプルをＴｉｅ特異的モノクローナル抗体と、前記モノクローナル抗体とその抗原の複合体を形成するのに適した条件下で接触させる工程、および
（ｃ）形成されたあらゆる複合体の存在を検出する工程からなる。
前記方法により検出されうる組織は、Ｔｉｅを含む内皮細胞または受容体Ｔｉｅを発現している白血病細胞を有するあらゆる正常な、前癌性のまたは癌性の固形腫瘍組織である。
本発明の１つの態様において、モノクローナル抗体は本明細書に記載されたような検出しうるマーカーで標識される。本発明の方法は様々な形態の癌の検出および識別に有用である。
また本発明は、ヒト血清中の循環しているＴｉｅ抗原量を測定することによる様々な癌の疾患状態の診断および監視方法を提供する。
また本発明のモノクローナル抗体は、細胞サンプルを本発明のモノクローナル抗体にさらす工程、および前記モノクローナル抗体の受容体Ｔｉｅへの結合を検出する工程からなる、細胞サンプル中の受容体Ｔｉｅの存在を検出する方法に使用してもよい。
本発明の好ましい態様において、本発明のモノクローナル抗体は、造血細胞、とくにＢ細胞系の細胞のある型の検出および監視に使用することができる。
細胞混合物を本発明のモノクローナル抗体にさらすことは、蛍光により活性化された細胞の選別（fluorescence-activated cell sorting）のばあいは、溶液中で行なうことができ、たとえば生検材料（biopsy material）などの固形組織標本上でも行なうことができ、またカラムクロマトグラフィーまたは直接免疫接着（direct immune adherence）を用いるばあいは、固体担体に固定化されたモノクローナル抗体を用いて行なうことができる。モノクローナル抗体にさらされる細胞混合物は、血液細胞または組織細胞のいかなる溶液であってもよい。好ましくは、細胞混合物は、正常哺乳類細胞、哺乳類の骨髄、循環血（circulating blood）または腫瘍が疑われる組織、さらに好ましくは正常細胞、白血病細胞および固形腫瘍細胞由来である。前記細胞混合物を前記モノクローナル抗体にさらしたのち、受容体Ｔｉｅを有するこれらの細胞は前記モノクローナル抗体に結合し、抗体－受容体Ｔｉｅ複合体を形成するであろう。抗体－受容体Ｔｉｅ複合体の存在、したがって受容体Ｔｉｅは、当該技術分野において既知の方法によって検出することができる。これらの方法はＥＬＩＳＡ、ＩＲＭＡ（サンドイッチ型免疫化学的分析法）、免疫組織化学的方法、^{125}Ｉ標識およびオートラジオグラフィーを用いたＲＩＡ含む。
創傷治癒、炎症またはヒト患者の腫瘍における脈管形成の存在を映像化する方法も本発明によって提供される。前記方法は標識された抗体の投与および内皮細胞が新しい脈管の形成に携わる部位を映像化することによる検出または血液、骨髄もしくは組織中の白血病細胞の検出からなる。
本発明のヒト化した（humanized）モノクローナル抗体を、受容体Ｔｉｅが結合している内皮細胞がかかわっている腫瘍性の疾患を有する患者に、前記モノクローナル抗体に接合した抗腫瘍治療剤の治療学的に有効な量投与することにより前記疾患を治療することは有用でありうる。治療剤の治療学的に有効な量は、腫瘍の成長の阻害をひきおこす、好ましくは腫瘍性細胞の死滅および生物中の腫瘍性細胞の総数の減少をひきおこす、任意の化合物量である。そのような治療剤の例は、放射性同位体^{90}Ｙまたは、たとえばリシンおよび異なる微生物毒素（microbial toxins）などの毒素結合体（toxin conjugates）に連結した抗体を含んでいる。
白血病治療剤の前記モノクローナル抗体への接合は、既知の技術、すなわちプレス（Press）ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー（J. Clin. Oncol.）、第７巻、１０２７～１０３８頁（１９８９年）に記載されたような技術を使用して達成することができる。好ましくは、前記モノクローナル抗体上の接合部位（conjugation site）は、前記モノクローナル抗体の受容体Ｔｉｅとの結合部位とは異なる位置である。また、治療剤上の接合部位は治療剤の活性部位とは異なる官能基であることも好ましい。また、より好ましくは、接合部位は前記モノクローナル抗体または治療剤のコンフォメーションの変化を

最小限にするような位置にある。
また本発明は、本発明のモノクローナル抗体の結合断片（binding fragment）に接合した治療剤の治療学的に有効な量の投与からなる腫瘍性疾患の治療方法に関する。適当な結合断片は、断片を受容体Ｔｉｅに結合させうるに充分な大きさと構造を保持する断片である。そのような断片は、当該技術分野において既知の多数の方法によって調製することができる。調製した結合断片は、実施例５に記載した結合分析（binding assays）を用いて受容体Ｔｉｅに対する結合能力を分析することができる。
本発明のモノクローナル抗体の投与は活性成分として前記モノクローナル抗体を含む医薬組成物の適当量の投与を含む。活性成分に加えて、前記医薬組成物は適当な緩衝剤、希釈剤および添加物を含んでいてもよい。適当な緩衝剤は、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、酢酸塩、グリシンおよびリン酸塩、好ましくはｐＨ６．５～７．５のリン酸塩を含んでいる。適当な希釈剤はＮａＣｌ、ラクトースまたはマンニトール、好ましくはＮａＣｌを用いて等張に調節した滅菌水性溶液を含んでいる。適当な添加物は表面への吸着を防ぐためのアルブミンまたはヘラチン（helartin）、界面活性剤（たとえばトゥイーン２０（ＴＷＥＥＮ２０）、トゥイーン８０（ＴＷＥＥＮ８０））、可溶化剤（たとえばグリセロール、ポリエチレングリコール）、抗酸化剤（たとえばアスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）および保存剤（たとえばチメルソル（Thimersol）、ベンジルアルコール、パラベン（parabens））を含んでいる。
投与は静脈内投与、皮下投与または筋肉内投与を含むあらゆる通常の手段によるものであってよい。好ましい投与経路は静脈内投与である。投与は１回投与（single dose）であってもよいし、分割した投与量を適当な回数に分けて行なってもよい。
好ましくは、医薬調製物は単位投与剤形（unit dosage form）である。そのような剤形において、前記調製物は活性成分の適当量、たとえば所望の目的を達成する有効量を含む単位投与量（unit doses）に細分される。
用いられる実際の投薬は、患者の要求および治療される状態の重症度（severity）に依存して変化しうる。特定の状況に対する適当な投薬の決定は、当該技術分野の技術範囲内にある。一般的に、治療は化合物の最適投与量よりも少ない投与量で開始される。そののちは、投与量を、その状況下での最適の効果が達成されるまで少量ずつ増加する。便宜的に１日の総投与量を分割してもよく、本質的に連続的に、または所望であればある日まで部分的に投与してもよい。投与の量および頻度は、治療される疾患の重症度だけでなく患者の年齢、状況および体重といった因子を考慮した治療を行なう臨床医の判断にしたがい調節されるであろう。
本発明における使用に対して推奨される典型的な投与計画は、１日あたり活性成分約０．１～１０ｍｇである。
治療剤としてのマウスモノクローナル抗体の開発および使用では、ヒト抗マウス抗体反応（ＨＡＭＡ）の成立（formation）により半減期が短縮されるという事実が問題となっている。それゆえ、患者におけるマウスモノクローナル抗体の効率は低い（アダイル（Adair）らによる概説（review）、１９９０年）。また外来の蛋白質を繰り返し投与すると、不利な副作用がおこる。これらの問題点の多くはヒトモノクローナル抗体の使用により解決することができる。現在これらの抗体は、マウスモノクローナル抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ）をヒトモノクローナル抗体と結合する分子生物学的技術を使用してマウスモノクローナル抗体から生成することができる。これらヒト化抗体は、ヒトの免疫療法における使用に適している。また１本鎖抗体（ｓｃＦｖ）も構築されるだろう。これらｓｃＦｖの構築において、抗原に対する抗体の結合を最適化するために、ウィットロウ（Whitlow）ら、プロテイン・エング（Protein Eng.）、第６巻（８）、９８９～９５頁（１９９３年）の文献に記載されたように、異なる長さのリンカー配列が使用されるであろう。
前記より明らかなように、本発明にかかわる抗体は、疾患の状態（たとえば様々な型の癌）の診断および同定、創傷治癒の検出および監視、様々な腫瘍性疾患の治療および予防に有用である。現在開示している主題のほかの用途も当業者には明白である。

実　施　例

以下の実施例は本発明の範囲を限定することなしに、本発明の特定の態様を説明するために与えられる。本発明のほかの用途および態様は当業者によって容易に認識される。

実施例１

バキュロウイルス（baculovirus）発現系におけるＴｉｅの細胞外ドメインの産生

Ｔｉｅ蛋白質のｃＤＮＡ配列は、本明細書に参考文献として記載されているパルタネンジェイ（Partanen J.）ら、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー（Mol. Cell Biol.）、第１２巻、１６９８～１７０７頁（１９９２年）の文献に開示されている。Ｔｉｅの細胞外ドメイン（アミノ酸２４～７６０）をコードするｃＤＮＡ配列を、以下のＰＣＲプライマー

5′-CGTAGATCTGGCGGTGGACCTGAC-3′および

5′-GGCCATGATCACTAGTGATGGTGATGGTGATGCTGCTGATCCAGG CCCTCTTCAGC-3′

を用いてＰＣＲで増幅し、ｐＶＴ－Ｂａｃベクター（テシアー（Tessier）ら、ジーン（Gene）、第９８巻、１７７～１８３頁（１９９１年））のＢａｍＨＩ部位にクローニングした。連続する６つのヒスチジン残基が続く第Ｘ因子開裂部位（ＩＥＧＲ）をコードする配列を、ｃＤＮＡの３′末端に挿入した。つぎに、えられたベクター（ｐＶＴ－Ｔｉｅと名づけられた）を、Ｔｉｅの細胞外ドメインの発現のために昆虫細胞にトランスフェクトした。

ｐＶＴ－Ｔｉｅベクターをバキュロ・ゴールド・バキュロウイルスＤＮＡ（Baculo Gold baculovirus DNA）（ファーミンゲン（Pharmingen）カタログ２１１００Ｄ）とともにＳＦ－９昆虫細胞にトランスフェクトした。ウイルスの単離物を、アガロース中でのプラーク分析法（plaque assay）により、トランスフェクトした細胞のコンディショントメディウム（ＴＮＭＦＨ＋５％ＦＣＳ）から精製し、ついでハイ・ファイブ・インセクト・セルズ（High Five insect cells）（インビトロゲン（Invitrogen））における組換え蛋白質発現について発現を試験した。単離物の１つ（ＢＧ－３ウイルス）を大規模な蛋白質産生のために選択した。

ハイ・ファイブ・セルズをＢＧ－３ウイルスに感染させ、２日後感染細胞のコンディショントメディウム（イーエックス－セル　４００（ＥＸ－ＣＥＬＬ　４００）、ジェイアールエイチ　サイエンティフィック（ＪＲＨ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を集めた。組換えＢＧ－３蛋白質をＣｏｎＡアフィニティークロマトグラフィーにより前記コンディショントメディウムから精製した。

実施例２

Ｂａｌｂ／Ｃマウスにおける抗Ｔｉｅモノクローナル抗体の産生

生後３カ月の雌のＢａｌｂ／Ｃマウスを、フロイント完全アジュバントで乳化したＢＧ－３の腹腔内注射（５０μｇ／マウス）により免疫した。３～４週間おきに、５０μｇのブースター注射（booster injections）をし、さらに３週間の間隔をおいたのち最終ブースター注射（ＰＢＳ中の２０μｇＢＧ－３を静脈内投与）をした。最終ブースター投与から４日後、マウスを屠殺し、マウス脾リンパ球をプラスマ細胞腫細胞ＳＰ２／０とそれぞれ２：１の割合で融合させた。融合細胞を、ウシ胎児血清（ＦＣＳ、２０％）およびＨＡＴ補足物（ＨＡＴ　supplement）（ヒポキサンチン－アミノプテリン－チミジン、ギブコ（Gibco）、０４３－０１０６０Ｈ、５０倍希釈）を含むイーエックス－セル３２０（ＥＸ－Cell　３２０）培地（セララブ（Seralab））を添加した９６ウェル培養プレート（ヌンク（Nunc））中からえた。細胞を５％CO_2雰囲気下、＋３７℃で培養した。１０日後、ＨＡＴ補足培地をＨＴ補足細胞培養培地（ギブコ、０４３－０１０６５Ｈ、５０倍希釈）に交換した。ＨＴ培地はアミノプテリンを含まないことを除くとＨＡＴ培地と同一であった。

融合から２～３週間後、特異的な抗体の産生を、実施例５に記載されている抗原特異的免疫蛍光分析法（antigen specific immunofluorimetric assay）（ＩＦＭＡ）により試験

した。マスタークローン（master clones）を限界希釈（limited dilutions）（スタスツェウスキー（Staszewski）、１９８４年）によりクローニングした。陽性クローンを２４ウェル組織培養プレート（ヌンク）上でふやし、前記と同様の方法により、再クローニングおよび再試験を行なった。陽性のクローンを蛍光活性化細胞選択法（fluorescence-activated cell sorting）（ＦＡＣＳ）により試験した。安定なクローンはＩｇＧクラスに属する免疫グロブリンを分泌した。

３Ｃ４Ｃ７Ｇ６と名づけられたあるクローンは、ＩＦＭＡにより免疫グロブリンクラスＩｇＧ１に属すると決定されたモノクローナル抗体を安定に分泌することがわかった。ハイブリドーマ３Ｃ４Ｃ７Ｇ６は、１９９３年１２月２日に、ドイツ連邦共和国、３３００ブラウンシュヴァイク（Braunschweig）、マシュロデル　ヴェク　１ベー（Mascheroder Weg 1b）のドイツ微生物および細胞培養コレクション（German Collection of Microorganisms and Cell Cultures）、ヒトおよび動物細胞培養ならびにウイルス部門（Department of Human and Animal Cell Cultures and Viruses）に寄託され、受託番号ＡＣＣ２１５９が与えられている。

類似した方法により、同一または異なるエピトープに対するＴｉｅ特異的モノクローナル抗体を産生するほかのクローンがえられた。そのようなクローンの１つである１０Ｆ１１Ｇ６を前記３Ｃ４Ｃ７Ｇ６とともにさらなる実験のために選択した。

腹水（ascites fluid）としてモノクローナル抗体を産生するためにＢａｌｂ／ｃマウスを使用した。プリスタン（pristane）（２，６，１０，１４－テトラメチル－ペンタデカン、９８％、アルドリッチ－ケミエ（Aldrich-Chemie）、デー（Ｄ）－７９２４、シュタインハイム（Steinheim）、カタログ番号Ｔ　２，２８０－２）でマウスを前処理したのち、前記ハイブリドーマを前記マウスに腹腔内（i.p.）注射した。ハイブリドーマ細胞の注射約２週間前にプリスタン０．５ｍｌを（腹腔内）注射した。注射した細胞数はマウス一匹あたり７．５～９×１０^{6}であった。ハイブリドーマを注射してから１０～１４日後に採取してえられた腹水は、実施例６に記載した抗原特異的ＩＦＭＡにより測定されたように平均０．３ｍｇ／ｍｌの抗体を含んでいた。

実施例３

ホローファイバー・バイオリアクター中での抗Ｔｉｅモノクローナル抗体のインビトロでの産生

Ｔｉｅに対するモノクローナル抗体を、テクノマウス・システム（Tecnomouse System）（セレックス社（Cellex Inc.））を使用してインビトロで産生した。はじめに、蓋およびフィルターを有する培地瓶を、１２１℃、１．１バールの圧力で３０分間オートクレーブした。ついで前記瓶を１リットルのダルベッコＭＥＭ（ギブコ、０４２－０２５０１、グルコース６．４ｇ／ｌ、グルタミン２ｍｍｏｌ／ｌ、０６６－１０５１Ｈ、ピルビン酸ナトリウム１ｍｍｏｌ／ｌ　０６６－１８４０Ｅを含む）で満たした。バイオリアクター・ホルダー（bioreactor holder）をテクノマウス・トレー（Technomouse tray）中に無菌的に移した。ポンプを充填（load）し、空の廃棄用瓶（流出系（outflow line））と同様に培地系（medium lines）に無菌的に接続した。

製造者の指示にしたがい、充填（fill）および排出プログラムを行ない、バイオリアクターのキャピラリー内空間（Intracapillary space）（ＩＣ）からのすべての保存材料（preserving material）を洗い出した。プログラムは流速１５０ｍｌ／ｈ、４時間で開始した。洗浄を、流速５０ｍｌ／ｈで２０時間、ダルベッコＭＥＭ（ＤＭＥＭ）中の５％ＦＣＳを用いたキャピラリー外（Extracapillary）（ＥＣ）空間の洗浄も同時に行ないながら続けた。ＥＣ空間の培地を無菌的に新しい培地と交換した。１日後、バイオリアクターをハイブリドーマ細胞を接種するために準備した。

ハイブリドーマ細胞を、１０％ＦＣＳ－ＤＭＥＭを含む細胞培養瓶中から採取し、ついで７２×１０^{6}の細胞を集め、５％ＦＣＳを含むＤＭＥＭ　５ｍｌ中に接種した。キャピラリー内空間の培地の流速は１００ｍｌ／ｈであった。モノクローナル抗体をうるために以下に示す循環方法を使用した。培地系を培地瓶の「出口（out）」に接続し、培地を瓶からバイオリアクターのキャピラリー内空間へ取り出し、培地を瓶へ戻す培地瓶の「入口（

in）」に流出系を接続した。モノクローナル抗体を、１週間に３回、月曜日、水曜日および金曜日に採取し、ＤＭＥＭ中に２．５％ＦＣＳを含む新しい培地１０ｍｌと毎回交換した。

抗ＢＧ－３細胞系である３Ｃ４Ｃ７Ｇ６は、細胞培養培地中に平均１５２μｇ／ｍｌの濃度で抗体を産生した。テクノマウス・システム中のバイオリアクターへの細胞の接種（細胞数７２×10^6）後、産生した抗体を２～３日おきに採取した。平均産生量は４．５ｍｇ／週であり、２カ月間の累積産生量は３７ｍｇであった。

腹水またはテクノマウス・システムのいずれかにおいて産生された抗体を、製造者の指示にしたがいアフィゲル・プロテインＡ・ＭＡＰＳII・キット（Affigel Protein A MAPS II Kit）（バイオラッド（Bio Rad））により精製した。カラムを精製手順のために結合緩衝液（binding buffer）（ｐＨ９．０）を用いて平衡化した。抗体は結合緩衝液中でプロテインＡマトリックスに結合し、（紫外線分光光学法（UV-spectrometry）により２８０ｎｍで検出し）ベースラインに達するまで、結合緩衝液を用いて洗浄した。特異的に結合した物質（material）を溶離緩衝液（elution buffer）を用いてｐＨ３．０でプロテインＡから溶離し、画分を直ちに中性化するために必要な１ｍｏｌ／ｌ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ９．０を含む管中に集めた。カラムは再生緩衝液を用いて再生し、つぎに使用するときまで、保存剤として０．０５％NaN_3を含む５０ｍｍｏｌ／ｌリン酸ナトリウム緩衝液ｐＨ７．５中で貯蔵した。

実施例４

細菌中で発現したＴｉｅに対する抗体の産生

ＴｉｅのｃＤＮＡのＢａｍＨＩ断片（ヌクレオチド５２０～１０８７）をｐＧＥＸｉＴベクター（ファルマシア（Pharmacia））のＢａｍＨＩ部位へサブクローニングし、結果としてＴｉｅ蛋白質のアミノ酸１６２～３５０をコードする領域が融合したグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼをコードする読取り枠（open reading frame）（ＧＳＴ－Ｔｉｅ２）をえた。前記構築物を大腸菌ＤＨ５ａ株にトランスフォームし、ＩＰＴＧにより融合蛋白質の発現を誘導した。えられた４０ｋＤの融合蛋白質を変性アガロースゲル（ＦＭＣ）中で精製し、ついで免疫感作に使用した。

ＢＧ－３　Ｔｉｅ蛋白質に対する記載と同様に、モノクローナル抗体を産生した。２つをサブクローニングした後、ＧＳＴ－Ｔｉｅ２蛋白質に対する抗体を分泌する８つのクローンをえた。これらは免疫ウエスタンブロッティングにおいてＴｉｅとほぼ等しく良好に反応した。抗ＧＳＴ－Ｔｉｅ２クローン由来の腹水を、プロテインＡカラムを用いて精製し、ウエスタンブロッティングに用いた。

実施例５

ユウロピウムを用いたＴｉｅ蛋白質の標識化

実施例１で生成したＴｉｅの細胞外ドメインＢＧ－３を、分析における使用のために標識した。標識はムッカラ（Mukkala）ら、アナリティカル・バイオケミストリー（Anal. Biochem.）、第１７６巻（２）、３１９～３２５頁（１９８９年）の文献にしたがい改変を加えて以下のように行なった。１２５ｍｏｌを超える量のイソチオシアナートＤＴＴＡ－Ｅｕ（Ｎ１キレート（N1 chelate）、ワラック（Wallac）、フィンランド共和国）をＢＧ－３溶液（５０ｍｍｏｌ／ｌホウ酸塩緩衝液中に０．５ｍｇ／ｍｌ、ｐＨ８．６）に添加し、ついで０．５ｍｏｌ／ｌ炭酸ナトリウム（メルク（Merck））緩衝液、ｐＨ９．８の１０分の１量を添加しｐＨを９．８に調整した。標識化を＋４℃で一晩行なった。結合しなかった標識は、溶離液としてのＴＳＡ緩衝液（０．１５ｍｏｌ／ｌ　ＮａＣｌを含む５０ｍｍｏｌ／ｌ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．８）とともにＰＤ－１０（ファルマシア、スウェーデン王国）を用いて除去した。

精製後、標識されたＢＧ－３に１ｍｇ／ｍｌウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を添加し、標識物を＋４℃で貯蔵した。

既知の$EuCl_3$標準の蛍光に対する蛍光の割合を測定することにより決定したＢＧ－３の１分子あたりに取り込まれたユウロピウムイオン数は２．９であった（ヘミッラ(Hemmilä)

ら、アナリティカル・バイオケミストリー、第１３７巻、３３５～３４３頁（１９８４年））。

実施例６

免疫蛍光スクリーニング分析法（Immunofluorometricscreening assay）（ＩＦＭＡ）

受容体Ｔｉｅに対して産生された抗体を、ウサギ抗マウスＩｇ（Ｚ２５９、ダコパッツ（Dakopatts）、ロブグレン（Lovgren）ら、タランタ（Talanta）１９８４年、第３１巻（１０Ｂ）、９０９～９１６頁）で被覆したマイクロタイター・ストリップのウェル（ヌンク（Nunc）、ポリソーブ（polysorb））を用いたサンドイッチ型免疫蛍光分析法を使用してスクリーニングした。あらかじめ被覆したウェルを洗浄溶液（デルフィア（ＤＥＬＦＩＡ））を用いたプレートウォッシュ（Platewash.）１２９６－０２４（ワラック（Wallac））により一度洗浄した。デルフィア分析緩衝液を、細胞培養上清および予備的スクリーニング分析（preliminary screening assays）における正の対照として使用した脾摘出したマウスの血清（１：１０００～１：１００，０００の希釈）の希釈緩衝液として使用した。

腹水として産生され、アフィゲル・プロテインＡ・ＭＡＰＳを用いて精製された抗ＢＧ－３　３Ｃ４Ｃ７Ｇ６を、のちの分析における標準として、分析緩衝液（１００μｌ、デルフィア）中０．２５～６０ｎｇ／ｍｌの濃度で使用した。

室温で２時間（または＋４℃で一晩）のインキュベーションを、５分間のプレートシェイク（Plateshake）（１２９６－００１、ワラック）上での振とうにより開始し、続いて前記洗浄溶液を用いて４回洗浄した。

実施例４で調製しＥｕで標識したＢＧ－３を、分析緩衝液１００μｌ中、１０ｎｇ／ウェルの濃度で添加した。プレートシェイク振とう機上で５分間および室温で１時間のインキュベートしたのち、前記と同様に前記ストリップを洗浄した。

エンハンスメント溶液（Enhancement solution）（デルフィア）を２００μｌ／ウェルで添加した。プレートを、プレートシェイク振とう機上で５分間振とうし、蛍光強度を１０～１５分間、アルクス（ARCUS）－１２３０（ワラック）により測定した（レブグレン(Lövgren)ら、コリンス　ダブリュー　ピー（Collins W.P.）（編）、オルターナティブ・イムノアッセイズ（Alternative Immunoassays）、ジョン・ウィレー・アンド・ソンズ社（John Wiley & Sons Ltd.）、２０３～２１６頁（１９８５年））。

サンドイッチ型デルフィアは非常に感度が高く、抗Ｔｉｅモノクローナル抗体に対する理論上の感度は０．２５ｎｇ／ｍｌよりも低い。この感度は、細胞培養上清中で産生されたモノクローナル抗体の定量に便利であるが、この分析方法はインビトロで産生されたモノクローナル抗体の定量にも実用的であった。直線である範囲は０．２５～６０ｎｇ／ｍｌに至った（図２）。分析内偏差（Intra assay variation）は非常に低いことがわかった。

実施例７

インビボでの受容体Ｔｉｅの検出のための放射性標識されたモノクローナル抗体

モノクローナル抗体３Ｃ４Ｃ７Ｇ６を、クロラミンＴ法（グリーンウッド（Greenwood）ら、ザ・バイオケミカル・ジャーナル（Biochem J.）、第８９巻、１１４～１２３頁（１９６３年））を用い^{125}Ｉで標識した。Ｎａ^{125}Ｉ　１ｍＣｉを抗体４０μｇの標識化に使用した。標識した抗体を、セファデックス－Ｇ２５（Sephadex-G25）を用いた溶離によって精製し、主画分１．８ｍｌをえた。

^{125}Ｉで標識された抗ＢＧ－３（３Ｃ４Ｃ７Ｇ６）を、１．２μｇおよび２．４μｇの２つの異なる投与量で、ルイス肺癌（Lewis-lung-carcinoma）を有するマウスに静脈内投与した。マウスにおける標識した抗体の生体内分布を、５つの異なる時点、１）６時間後（Ｎ＝４）、２）２４時間後（Ｎ＝７）、３）４７時間後（Ｎ＝５）、４）７０時間後（Ｎ＝３）および５）１１７時間後（Ｎ＝２）において測定した。

表１　１～５の時点における組織への生体内分布

	1	2	3	4	5
	% ID/g	% ID/g	% ID/g	% ID/g	% ID/g
	6 h	24 h	47 h	70 h	117 h
血液	36.22871	11.26086	9.343041	7.87285	2.749225
心臓	7.828641	2.842418	1.932395	1.391288	0.548053
大動脈	16.07039	5.553582	3.707159	3.166192	0.798207
肺	9.091084	3.823566	3.087934	2.555693	0.987308
肝臓	6.940821	2.355467	1.770392	1.568976	0.685282
腎臓	9.331627	3.490624	2.556933	1.829169	0.802883
脳	0.548253	0.228239	0.149502	0.146163	0.042287
血管	22.64432	4.712374	2.435758	2.65011	0.485038
腫瘍	7.151142	3.620555	3.155919	2.179194	0.901169
脾臓	5.840843	2.004754	1.396837	1.195612	0.622342
膀胱	6.889924	4.36051	3.628196	3.523912	0.899099
卵巣	8.445497	3.617958	2.622101	2.387713	0.662774

結果は、抗ＢＧ－３活性は血液、腫瘍および血管に集中し、肺および卵巣においてもある程度集中していることを示している。血液中の活性は、４８時間および７０時間後でそれぞれ９．３％ＩＤ／ｇおよび７．９％ＩＤ／ｇと高かった（２０ｇのマウスに規準化した組織の１グラムあたりに注射した投与量の百分率）。血液中の抗Ｂｇ－３活性は２４時間後で１１．３％、６時間後で３６．２％であった。

^{125}Ｉで標識された抗ＢＧ－３（３Ｃ４Ｃ７Ｇ６）を、皮膚の上皮に８日間経過した創傷を有するマウス（「創傷治癒マウス」）にも投与した。創傷治癒マウスに与えた抗体の投与量は動物あたり０．０３μｇであった。抗体活性の生体内分布を図３に示す。この図において、Ｙ軸は注射した投与量の百分率（％ＩＤ／ｇ）を表わし、Ｘ軸は注射の様々な時点、すなわち４時間後（Ｎ＝２）、２４時間後（Ｎ＝６）、４８時間後（Ｎ＝６）、７２時間後（Ｎ＝４）および１２０時間後（Ｎ＝４）を表わす。標的と血漿の間に成立した平衡を図３に示す。

実施例８

映像化研究のための抗Ｔｉｅモノクローナル抗体のテクネチウム９９ｍ（Ｔｃ－９９ｍ）による標識化

抗体を、シュワルツ（Schwarz）ら、ジャーナル・オブ・ヌクレアー・メディシン（J. Nucl. Med.）、第２８巻、７２１頁（１９８７年）およびマザー（Mather）ら、ジャーナル・オブ・ヌクレアー・メディシン、第３１巻、６９２～６９７頁（１９９０年）の技術を用いてテクネチウム９９ｍで標識した。２－メルカプトエタノール（ＭＥ）を使用し、免疫グロブリンのヒンジ領域におけるＨ鎖のジスルフィド結合を開裂した。抗体を約１０ｍｇ／ｌに濃縮し、ついで充分量のＭＥを抗体溶液に添加し、１０００：１のモル比（０．４７μｌ　ＭＥ／１ｍｇ抗体）にした。混合物を室温で３０分間インキュベートし、還元した抗体を２０ｍｌセファデックス－Ｇ－５０（Sephadex-G-50）カラムでのゲルろ過により精製し、移動相としてリン酸塩緩衝化生理食塩水を使用して溶離した。２８０ｎｍでの光学密度の測定後、抗体画分を貯め、テクネチウム９９ｍで標識するための０．５ｍｇのアリコートとして－２０℃で貯蔵した。

テクネチウム９９ｍで標識するとき、抗体のアリコートを解凍し、０．９％滅菌生理食塩水５ｍｌとともにメチレンジホスホネート（ＭＤＰ）・ボーン・イメージング・キット（methylene diphosphonate(MDP) bone imaging kit）（アメスキャン・メドロネート・II・テクネチウム・ボーン・エージェント（Amerscan Medronate II Technetium Bone Agen

t）、エヌ（Ｎ．）165）を製造者の指示にしたがい使用して再構成した。ＭＤＰ　３５μｇおよびSnF_2　２．４μｇを含むＭＤＰ溶液３５μｌを抗体アリコートに添加し、充分に混合した。テクネチウム９９ｍ　過テクネチウム酸塩（９９ｍ Tc pertechnetate）を混合物に添加し、穏やかに振とうした。反応は１０分間で完了した。放射化学純度を高速液体クロマトグラフィーによって測定した。

標識の非特異的結合は最小限であるので、還元した抗体の標識化により安定なテクネチウム９９ｍで標識した免疫グロブリンがえられる。標識効率を０．９％生理食塩水中で展開した薄層クロマトグラフィーにより評価する。免疫反応性は少なくとも８５％保たれている。インビボでの安定性は、インビトロでのシステイン・チャレンジ・アッセイ（cysteine challenge assay）により分析されるであろう。

テクネチウム９９ｍで標識した抗Ｔｉｅ抗体は、通常のガンマカメラ（gamma-camera）または人体中の抗体の流速（flow rate）を可視化するＳＰＥＣＴ（単一光子発光コンピュータ連動断層撮影（Single Photon Emission Computerized Tomography））を用いて検出することができる。

実施例９

ＦＡＣＳによるＴｉｅ陽性細胞系の検出

実施例２、３および４において生成した抗Ｔｉｅ抗体を、ヒト白血病細胞系中のＴｉｅ蛋白質の検出に使用した。

造血細胞系であるＨＥＬ（ヒト赤白血病）およびＭＯＬＴ－４（Ｔ－リンパ芽球性白血病（T-lymphoblastic leukemia））をＡＴＣＣよりえた。ＨＥＬ細胞（赤血球および巨核球マーカーとともに発現（co-express）するヒト赤白血病細胞を、生成したモノクローナル抗体を使用するＴｉｅの間接的免疫蛍光染色（indirect immunofluoresence staining）およびＦＡＣＳ分析に使用した。計数し、洗浄し、抗体のいくつかの希釈物（１：１～１：２００）の存在下でインキュベートした細胞を、洗浄し、ついでマウス免疫グロブリンに対するＦＩＴＣに接合した抗体（FITC-conjugated antibodies against mouse immunoglobulins）（第２の抗体）の存在下でインキュベートした。ＦＡＣＳ　ＩＶにより分析を行なった。負の対照として、細胞を非特異的マウス免疫グロブリンを用いて染色し、続いて同じ第２の抗体によって処理した。負の細胞の対照として、ＴｉｅのｍＲＮＡを発現しないＭＯＬＴ４　Ｔ細胞性白血病系細胞を使用した。

結果は、抗Ｔｉｅ抗体は平均８５％のＨＥＬ細胞を染色し、一方ＭＯＬＴ細胞の１％未満しかＴｉｅに対して陽性に染色されないことを示す。これら２つの系由来の細胞を混合したとき、抗体は陽性のＨＥＬ細胞と陰性のＭＯＬＴ細胞とを区別する（図１）。また、ヒト骨髄サンプル由来の細胞でもこれらの抗体で陽性に染色されたのは１％未満であった。ヒト白血球細胞系ＭＯＬＴ４由来の細胞（ＴｉｅのｍＲＮＡ陰性である悪性Ｔ細胞系）およびＨＥＬ（ヒト赤白血病細胞系、ＴｉｅのｍＲＮＡ陽性）を約１：１の割合で懸濁状態にて混合した。ついで細胞を、１：１０に希釈した実施例２でえられたモノクローナルＴｉｅ抗体および第２の抗体としてＦＩＴＣに接合した抗マウスＩｇＧを使用して懸濁液中で染色した。負の対照として、抗体を正常マウス血清と置換した。ＦＡＣＳ　ＩＶを使用して分析を行なった。結果は２つの異なる細胞群、すなわち１つはＴｉｅ陽性であり、一方はＴｉｅ陰性であった。各群は分析した細胞群全体の約５０％からなっていたことを示している（図１）。

あるＴｉｅ陽性骨髄細胞はＣＤ１９であるＢ細胞マーカーにも陽性であり、すべての細胞はＣＤ３８に陰性であった。これはＴｉｅはＢ細胞系統において発現することを示している。

実施例１０

モノクローナル抗体の分析

モノクローナル細胞培養上清を、ＦＡＣＳ分析を使用して、細胞表面上の受容体Ｔｉｅを認識する能力を試験した。ＨＥＬ細胞（内生の受容体Ｔｉｅを発現しているヒト赤白血病細胞系）およびＭＯＬＴ－４細胞（Ｔｉｅを発現していないヒトＴ細胞性白血病細胞系）に加えて、Ｔｉｅ発現ベクター（ｐＬＴＲpoly中に全長のＴｉｅ　ｃＤＮＡを含む、マケ

ラ（Makela）ら、１９９１年）をトランスフェクトしたＮＩＨ３Ｔ３細胞および対照のベクター（ｃｏｎｔｒｏｌ vector）をトランスフェクトしたＮＩＨ３Ｔ３細胞を、異なる細胞クローンのコンディションドメディウムとインキュベートし、続けてＦＩＴＣで標識したウサギ抗マウス抗体（ダコ（Dako））とインキュベートした。標識された細胞を、フルオレッセンス・アクティベーティッド・セル・ソーター（fluorecence activated cell sorter）（ベクトン　ディッキンソン（Beckton Dickinson）により分析した。
以下に示すクローン、１Ｈ３Ｈ７、３Ｃ４Ｃ７、５Ｃ１２Ｈ９からも腹水を生成した。クローン３Ｃ４Ｄ７をさらにクローニングし、互いに類似するサブクローンである３Ｃ４Ｃ７Ｇ６、３Ｃ４Ｃ７Ｂ１１、３Ｃ４Ｃ７Ｅ７、３Ｃ４Ｃ７Ｆ９をえた。

表２　細胞外ドメインに対する抗Ｔｉｅモノクローナル抗体の結果

クローン	デルフィア	スロットブロット BG-3 培地	スロットブロット 変性	ウエスタン	FACS
1H3F10	+++	+++	+++	(+)	-
H6	+++	+++	+++	(+)	-
H7	+++	+++	+++	(+)	-
3C4C7	+++	+++	+	-	++
E4	+++	++	(+)	-	+
G4	+++	++	(+)	-	+
5C12G11	+++	+++	+++	-	-
H9	+++	+++	+++	(+)	-
6A11A11	++	++	+	-	+
H6	++	++	(+)	-	+
H9	++	++	+	-	+
9B10E6	+	++	+++	-	-
G7	+	++	+++	-	-
9E7E9	+++	+++	+++	(+)	-
E10	+++	++	++	(+)	-
H6	+++	++	++	(+)	-

実施例１１
ヒト血液細胞におけるＴｉｅのイムノペルオキシダーゼ染色
造血幹細胞を末梢血へ移動させるために、シクロホスファミドを患者に与え、７日後末梢血から被膜形成細胞（buffy coat cells）を集めた。赤血球を細胞懸濁液から溶血し、細胞画分を遠心分離してえたスライドを調製した。つぎに、これらを精製Ｔｉｅモノクローナル抗体３Ｃ４Ｃ７Ｇ６を用いる免疫染色およびイムノペルオキシダーゼ法に使用した。２重の免疫蛍光染色による骨髄細胞の分析において、Ｔｉｅ陽性細胞（１％未満）は明確な造血系列に帰属（assign）することはできなかった。スライド上の約７０，０００の細胞のなかで、５つの陽性染色細胞を同定した。イムノペルオキシダーゼ染色において、Ｔｉｅ陽性細胞は巨大な核とわずかの細胞質（scant cytoplasm）を有し、小型で丸かった（図２）。（図中の１つの陽性細胞の濃く染色されたところはペルオキシダーゼ反応の結果であり、Ｔｉｅ陽性細胞を同定する。）したがって抗Ｔｉｅモノクローナル抗体は骨髄由来の特定の造血細胞を同定し、造血細胞の定義されたサブセットの同定に使用しうる。
実施例１２
モノクローナル抗体３Ｃ４Ｃ７Ｇ６のヒト化（Humanization）
３Ｃ４Ｃ７Ｇ６は、すでに記載された方法（コルビンガー（Kolbinger）ら（１９９３年）、ケットルボロー（Kettleborough）ら（１９９１年））を用いてヒト化しうる。ヒト化の手順は、マウスのカッパ軽（Ｌ）鎖および重（Ｈ）鎖の相補性決定領域（ＣＤＲｓ）のヒト可変（Ｖ）領域への組み込み、および原型のＣＤＲコンホメーションを保存するた

めに、ヒト構造領域における点変異をおこすことを含む。再形成（reshaped）されたＶＬおよびＶＨ鎖は、適当な発現ベクターで、ヒトカッパおよびガンマ－１定常領域をそれぞれコードするＤＮＡに結合される。
ｓｃＦｖの生成は、すでに記載したようにウィットロウら（前出）（１９９３年）の文献により達成される。
ヒト化モノクローナル抗体およびｓｃＦｖの親和性を本明細書中の前記の方法を用いて試験する。
実施例１３
Ｔｉｅ特異的モノクローナル抗体の治療剤への接合
モノクローナル抗体３Ｃ４Ｃ７Ｇ６または実施例１２に記載したヒト化抗体は、ほかの実施例に記載したように診断用途のために、またはえられた結合体の治療学的用途のために、種々の物質（agent）に連結または接合しうる。
腫瘍およびたとえば白血病などの分散した悪性疾患の治療における使用のために、抗体をたとえば^{32}Ｐ、^{131}Ｉ、^{125}Ｉ、^{90}Ｙ、^{188}Ｒｅ、^{212}Ｐｂ、^{212}ＢｉまたはBなどの放射性同位体と連結しうる（シェインバーグ（Scheinberg）ら、オンコロジー（Oncology）、第１巻３１～３７頁（１９８７年））。放射性同位体の抗体への接合は、放射性同位体を抗体に直接つけることにより、当該技術分野において記載されている方法（シュワルツジェイ（Schwartz J.）、ヌクレアー・メディシン（Nuclear Medicine）、第２８巻、７２１頁（１９８７年））により、放射性同位体を抗体に結合させるキレートリンカー（chelate linkers）を用いることにより、または特異的な抗体に対する第２の抗体によって達成される。そのほか様々な物質を抗体につけうる。そのような物質は抗腫瘍剤、挿入（intercalation）によるＤＮＡとの相互作用（たとえば、ダウノマイシン、アドリアマイシン、アクラシノマイシン）、またはＤＮＡの開裂（たとえば、エスペラマイシン（esperamaycin）、カリケアマイシン（calicheamycin）、ネオカルチノスタチン）により毒性を有する抗生物質、ならびにたとえばシスプラチン、ビンブラスチンおよびメトトレキサートなどのそのほかの毒性を有する細胞増殖抑制剤（たとえばグリーンフィールド（Greenfiels）ら、アンチボティ、イムノコンジュケーツ・アンド・ラジオファーマシューティカルズ（Antibody, Immunoconjucates and Radiopharmaceuticals）、第４巻、１０７～１１９頁（１９９１年））を含んでいる。これらの物質は、これらの適当な誘導体を共有的につけることにより連結される。
多くの蛋白質および糖蛋白質は抗体の治療学的結合体における使用にも利用できる。これらは、たとえばジフテリア毒素、赤痢菌毒素（Shigella toxin）およびシュードモナス細胞外毒素（Pseudomonas exotoxin）などの細菌性毒素、ならびにたとえばリシン、アブリン（abrin）、モデシン（modeccin）、ビスカミン（viscumin）、ポークウィード抗ウイルス蛋白質（pokeweed antiviral protein）、サポリン（saporin）、モモルジン（momordin）およびゲロニン（gelonin）などの植物性毒素を含む。これらの毒素は、触媒断片（catalytic fragment）およびあるばあいには、細胞表面構造を認識するか、細胞膜を通るトランスロケーション（translocation）を促進する断片またはドメインを含む。適当に修飾された毒素を使用することにより、有効性を失うことなく特異性を改善することができる。毒素の抗体への接合は、たとえばＮ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルチオ）－プロピオネート（ＳＰＤＰ）または２－イミノチオレンなどの異なる２つの官能基をもつクロスリンカー（heterobifunctional crosslinkers）により行なわれる。
治療学的使用のまえに、接合した抗体を、毒性の有効性（toxic potency）、標的に対する特異性、インビトロおよびインビボでの安定性ならびにそのほかの特性の観点から試験した（たとえば、イムノトキシンズ（Immunotoxins）、フランケル（Frankel）編、クルワー・アカデミック・パブリシャーズ（Kluwer Academic Publishers）、ボストン、１９８８年）。使用する連結手段によって与えられる、接合した物質の毒性および抗体の結合親和性および特異性への影響は、最小限であることが望ましい。それゆえ、結合体の受容体Ｔｉｅへの結合について試験を行なう（実施例１０参照）。たとえば白血病細胞系Ｄａｍｉなどの標的細胞に対するインビトロでの毒性は、対照の結合体で処理した細胞培養物

への標識した化合物の取り込みに対する、処理した細胞培養物中における前記取り込みを測定することによって、ならびにクローン原性中で増殖することができる培養物の決定およびセル・グロース・バック－エクストラポーレーション・アッセイ（cell growth back-extrapolation assays）によってより直接的に試験する。インビボでの安定性、クリアランスおよび特異的な毒性を、たとえばマウス、ラット、ウサギまたはサルなどの適当な受け入れ動物に結合体を投与することにより判断する。さらに、そのような受け入れ動物は、正常マウスおよびたとえばヌードマウスまたはＳＣＩＤマウスなどのマウスの免疫不全系統に導入されたヒト腫瘍細胞からなるインビボの腫瘍モデルおよび白血病異種移植モデルを含んでいる。

実施例１４

モノクローナル抗体３Ｃ４Ｃ７Ｇ６を含む医薬組成物の調製

本発明の医薬組成物は、活性成分であるＴｉｅ特異的モノクローナル抗体、とくにモノクローナル抗体３Ｃ４Ｃ７Ｇ６の有効量を単独で、または適当な緩衝剤、希釈剤および／または添加物とともに含んでいる。そのような組成物は、滅菌水性溶液または凍結乾燥もしくはそのほかの方法で乾燥した製剤として提供される。典型的には、抗体はそのようなビヒクル中、約１～１０ｍｇ／ｍｌの濃度で製剤化される。

注射用の適当な医薬組成物の一例は、滅菌水中のトゥイーン８０（Ｔｗｅｅｎ　８０）（０．２ｍｇ／ｍｌ）および一塩基性リン酸ナトリウム塩（０．４５ｍｇ／ｍｌ）の緩衝溶液（ｐＨ７．０±０．５）中のモノクローナル抗体３Ｃ４Ｃ７Ｇ６（１ｍｇ／ｍｌ）を含む。本発明にかかわる医薬組成物は、標的となる疾患、症状の重さおよび患者の特性を考慮した当業者により決定された投与量で投与される。たとえば、本発明の医薬組成物は、腫瘍の増殖および新生血管形成の停止または創傷治癒において最大限の利益をうるために局部的に適用されてもよい。しかしながら、全身への使用では、たとえば体重、年齢、疾患の進行、代謝およびそのほかの事項などの患者の特性に依存して異なった投与量が必要になる。

さらなる態様は、先の記載を考慮した当業者には明らかであろう。したがって、本発明は以下の請求の範囲のみに限定されない。

実施例１５

正常な脳、膠芽腫多形（glioblastoma multiforme）および黒色腫転移におけるＴｉｅの免疫組織化学的染色

前もって処置をしていない大脳神経膠腫および頭蓋内髄膜腫（intracranial meningeomas）の新鮮なサンプルを、ヘルシンキ大学中央病院の神経外科部門での開放外科手術（open surgery）においてえた。すべての腫瘍患者はコルチコステロイドの投与を受けていた。非腫瘍性の対照の脳組織のサンプルを、難治性てんかんの手術においてえた。いくつかの腫瘍サンプルは隣接していた脳組織を含んでいた。すべてのサンプルは、手術による除去後なるべく早く液体窒素中で凍結し、－７０℃で貯蔵した。組織病理学的診断は、隣接したホルムアルデヒド固定化腫瘍標本の慣例的に染色したパラフィン切片にもとづくだけでなく、ヘマトキシリン／エオシンで染色したクリオスタット切片にもとづいても行なった。サンプルの完全な一覧表を表３に示す。

表３　ヒト組織標本

番号	組織サンプル	年齢（歳）	性別
1	対照である脳	66	男
2	対照である脳	11	女
3	Ⅱ度小星状細胞腫	34	女
4	Ⅱ度小星状細胞腫	66	男
5	Ⅲ度小星状細胞腫	36	男
6	GBM	53	男
7	GBM	63	男
8	GBM	56	男
9	GBMに隣接した組織	69	女
10	Ｉ度髄膜腫	52	男
11	Ⅱ度髄膜腫	35	女
12	Ⅱ度髄膜腫	55	男
13	黒色腫転移	54	男
14	黒色腫転移に隣接した組織	67	男
15	Ⅲ度神経膠腫	44	男
16	GBM	65	男

ＧＢＭ＝膠芽腫多形

滅菌したスライドを、組織の接着を確実にするためにアセトン中の２％　３－アミノプロピルトリエトキシシラン（テスパ（ＴＥＳＰＡ））に浸漬した。５μｍクリオスタット切片を－２０℃下で前処理したスライド上にのせ、４％パラホルムアルデヒドで固定し、ついで－７０℃で貯蔵した。

追加の２つの悪性神経膠腫サンプルだけでなく、インサイチュ（in situ）・ハイブリダイゼーション分析に用いるサンプル由来の５μｍクリオスタット切片を、前記と同様にテスパスライド上にのせた。切片を３７℃で一晩真空乾燥し、ヒトＴｉｅに対するマウスモノクローナル抗体（Ｔｉｅ細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体のカクテル）および内皮細胞に特異的なマーカーとして、ヒトのフォンビルブラント因子（ｖＷＦ）に対するウサギ抗体（ダコパッツ（Dakopatts））を用い、免疫組織化学的に染色した。

染色をマウスＩｇＧ用ベクタステイン・ＡＢＣ・エリート・ビオチン／アビジン・システム（Vectastain ABC Elite biotin/avidin system for mouse IgG）（ベクター・ラボラトリーズ（Vector Laboratories）、ブルリンゲーム（Burlingame）、カリフォルニア（ＣＡ））を用いて行なった。乾燥し、固定していない組織切片中の内因性ペルオキシダーゼ活性を、メタノール中の０．５％　H_2O_2を用いた３０分間の処理によりブロックした。ＰＢＳ洗浄後、切片を希釈したベクタステイン・ブロッキング血清（diluted Vectastain blocking serum）とともに２０分間インキュベートし、ついで希釈していないＴｉｅ抗体（１：１）とともに４℃で一晩、またはフォンビルブラント因子抗体（１：５０）とともに室温で１時間インキュベートした。ビオチン化した第２の抗体を４５分間かけて添加し、続いてベクタステインＡＢＣ試薬を３０分間かけて添加した。反応を０．２ｍｇ／

ｍｌ　３－アミノ－９－エチルカルバゾール（ＡＥＣ）、０．０３％H_2O_2、１４ｍＭ酢酸および３３ｍＭ酢酸ナトリウムを用いて可視化した。正常の血清および抗原をブロックする第１の抗体（antigen-blocked primary antibody）を対照として用いた。切片をヘマトキシリン中で穏やかに対比染色し、アクアマウント（Aquamount）中に置いた。
正常皮質組織内の血管はＴｉｅ蛋白質に対して陰性であった（図４）、他方、膠芽腫の脈管構造（Ｂ）およびＧＢＭに隣接した組織の内皮（挿入図、Ｂ）においては濃い染色がみられた。また、Ｔｉｅ蛋白質は腫瘍に面する内皮細胞だけでなく（データは示さず）、黒色腫転移（Ｃ）中の血管に並ぶ内皮細胞においても検出された。非特異的染色は、抗原をブロックする抗体またはＴｉｅ抗体の代りに正常血清とともに切片をインキュベートしたときにみられた。Ｔｉｅ染色の程度および特異性をさらに評価するために、隣接する切片を第VIII因子について染色した（Ｄ）。Ｔｉｅ染色の結果の要約を表４に示す。

表４　Ｔｉｅ免疫組織化学染色

番号	組　織	Ｔｉｅ抗体
2	正常な脳	－
15	Ⅲ度神経膠腫	＋＋
7	ＧＢＭ＊	＋＋＋
16	ＧＢＭ	＋＋＋
11	Ⅰ度髄膜腫	＋＋
13	黒色腫転移	＋＋

これらの結果は、腫瘍の進行をともなう血管形成におけるＴＩＥの重要な役割を支持している。

実施例１６

血管芽腫および血管周囲細胞腫におけるＴｉｅ蛋白質の免疫組織化学的検出

本研究において、我々は論争の的になっている（controversial）起源の２つの高度な血管性ＣＮＳ腫瘍、すなわち毛細管の血管芽腫および血管周囲細胞腫における内皮細胞成長因子（endothelial growth factors）およびそれらの受容体の発現を分析した。
血管芽腫および血管周囲細胞腫の新鮮なサンプルを、ヘルシンキ大学中央病院の神経外科での手術においてえた（すべての腫瘍患者はコルチコステロイドの投与を受けていた）。サンプルを手術による除去後直ちに急速冷凍（snap frozen）し、－７０℃で貯蔵した。
組織病理学的診断は、ヘマトキシリン／エオシンで染色したクリオスタット切片にもとづき、また隣接したホルムアルデヒド固定化腫瘍標本の慣例的に染色したパラフィン切片にもとづいて行なった。
滅菌したスライドを、組織の接着を確実にするためにアセトン中の２％　３－アミノプロピルトリエトキシシラン（テスパ）で処理した。５μｍクリオスタット切片をスライド上にのせ、ＰＢＳ中の４％パラホルムアルデヒドで固定し、ついで－７０℃で貯蔵した。
インサイチュ・ハイブリダイゼーション分析に用いるサンプル由来の５μｍクリオスタット切片を、前記と同様にテスパスライド上にのせた。切片を３７℃で一晩真空乾燥し、ヒトＴｉｅに対するマウスモノクローナル抗体（Ｔｉｅ細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体、ユハ　パルタネン（Juha Partanen）博士より提供された種類）ならびに内皮細胞に特異的なマーカーとしてのヒトのフォンビルブラント因子（ｖＷＦ）およびＣＤ３４に対するウサギ抗体（ダコパッツ）を用い、免疫組織化学的に染色した（３６）。
染色をマウスＩｇＧ用ベクタステイン・ＡＢＣ・エリート・ビオチン／アビジン・システ

ム（ベクター・ラボラトリーズ、ブルリンゲーム、カリフォルニア）を用いて行なった。乾燥し、固定していない組織切片中の内因性ペルオキシダーゼ活性を、メタノール中の０．５％ H_2O_2を用いた３０分間の処理によりブロックした。ＰＢＳ洗浄後、切片を希釈したベクタステイン・ブロッキング血清とともに２０分間インキュベートし、ついで希釈していないＴｉｅ抗体（１：１）とともに４℃で一晩、またはＣＤ３４／フォンビルブラント因子抗体（１：５０）とともに室温下で１時間インキュベートした。ビオチン化した第２の抗体を４５分間かけて添加し、続いてベクタステイン・ＡＢＣ試薬を３０分間かけて添加した。反応を０．２ｍｇ／ｍｌ　３－アミノ－９－エチルカルバゾール（ＡＥＣ）、０．０３％ H_2O_2、１４ｍＭ酢酸および３３ｍＭの酢酸ナトリウムを用いて可視化した。正常の血清および抗原をブロックする第１の抗体を対照として用いた。切片をヘマトキシリン中で穏やかに対比染色し、アクアマウント中に置いた。

Ｔｉｅ蛋白質の強い発現は、血管芽腫（図４、Ａ、Ｂ）および程度は低くなるが血管周囲細胞腫（Ｃ～Ｆ）の両方における血管内壁に沿ってみられた。Ｔｉｅ蛋白質のレベルは、腫瘍組織内で実質上変化した。たとえば、ゆるやかな構造の（loosely textured）血管周囲細胞腫領域（Ｅ、Ｆ）では高く、より典型的な腫瘍サンプル（Ｃ、Ｄ）では低かった。しかしながら、総体的な発現は以前分析した正常な皮質標本（２３）においてみられた発現よりもかなり高かった。ｖＷＦ免疫染色（Ｂ、Ｄ、Ｆ）と比較して、Ｔｉｅは血管周囲細胞腫の腫瘍細胞（Ｃ～Ｆ）では発現しなかった。

これらの結果は、Ｔｉｅはこれら２種類の血管腫瘍における脈管形成において役割をはたしているかもしれないという仮説と一致する。

実施例１７

マウスのルイス肺癌モデルにおけるインビボでの抗Ｔｉｅ抗体の取り込み

我々は、悪性成長（malignant growth）の検出における抗Ｔｉｅモノクローナル抗体使用の可能性を決定するために、マウスの主要臓器および肺転移（lung metastases）における放射性同位体で標識された（^{125}Ｉ）抗ＴＩＥモノクローナル抗体（１０Ｆ１１Ｇ６および３Ｃ４Ｃ７Ｇ６）の取り込みを研究した。

抗体の放射性同位体による標識を以下のように行なった。抗体４０μｇを、クロラミンＴ法を用い３７ＭＢｑ　Ｎａ－^{125}Ｉで標識した（前記グリーンウッドら、１９６３年）。標識された抗体をセファデックス－Ｇ２５（Sephadex-G25）を用いて精製し、主画分１．８ｍｌをえた。インビボでの生体内分布の研究の前に、３種の放射性同位体で標識された抗体（３ｃ４、１０Ｆ１１、７Ｅ８）の親和性を細胞分析において比較した（リンドモ（Lindomo）、ヌクル・メド（Nucl Med）、第２１巻、８０７～８１０頁（１９８４年））。すべての抗体は、細胞外表面上に受容体Ｔｉｅを発現しているトランスフェクトされたマウス内皮細胞であるＬＥ　ＧＤ　１４－２細胞に特異的に結合するが、１０Ｆ１１の結合はそのほかのものよりも３倍高かった（２１ｐｍｏｌ／１０００００ｃｅｌｌｓに対して６～７ｐｍｏｌ／１０００００ｃｅｌｌｓ）。

肺癌の実験において、我々は、動物一匹当り１～１０Ｍｃｅｌｌｓ／０．２５ｍｌを右脚に筋肉内注射して増殖させたルイス肺癌（ＬＬＣ１／２）異種移植片を有する６～８週令の雌マウス（Ｃ５７ＢＩ／６、ボムホルトガード（Bomholtgaard）、デンマーク王国）を使用した。

マウスの甲状腺遮断（thyroid blockade）を、放射性同位体で標識した抗体の注射１日前に開始し、適宜ＫＩ溶液（４００ｍｇ／１００ｍｌ）を用いて実験中続けた。

^{125}Ｉ抗Ｔｉｅ抗体の生体内分布を、２０ｍＭ　ＰＢＳ中の抗体３０ｎｇの静脈注射後、２４時間後、４８時間後、７２時間後、９６時間後および１２０時間後に調べた。ルイス肺癌の肺転移（lung metastases）を有する動物１４匹を、抗体１０Ｆ１１を用い、２４時間後に１匹、４８時間後に３匹、７２時間後に３匹、９６時間後に３匹、７日後に４匹調べた（図６参照）。肺転移は、２４時間後、４８時間後および１２０時間後の３匹においてのみ、抗体３ｃ４とともに存在した（図７参照）。

３ｃ４は、４８時間後の肺における転移への結合を示していない（組織対血液（tissue-to-blood）＝０．０７）が、９６時間後においては、３Ｃ４Ｃ７Ｇ６および１０Ｆ１１Ｇ

６はともにルイス肺癌モデルの転移に結合し、組織対血液の割合はそれぞれ２．４および２．８である。
肺転移における抗体３ｃ４および抗体１０Ｆ１１の取り込みは類似しており、両抗体ともにインビボで転移に結合した。しかし、１０Ｆ１１はより強く血清に結合した。すなわち、４８時間後において１０Ｆ１１は２０％ＩＤ／ｇに対し、３ｃ４は１０％ＩＤ／ｇであった。

実施例１８

ＩＲＭＡ分析による血清サンプルの分析

非癌患者および癌患者の血清サンプルを、サンドイッチ型のイムノラジオメトリック分析法（immunoradiometric assay）（マイルス　エル（Miles L.）ら、ネイチャー（Nature）、第２１９巻、１８６～１８９ページ（１９６８年））を用いて選別（screened）した。前記分析方法では捕捉（catching）抗ＴＩＥ抗体がポリスチレンチューブ中に被覆されており、第２の抗ＴＩＥ抗体が前記クロラミンＴ法を用いて^{125}Ｉで放射性標識されている。組み換えＴＩＥ蛋白質を、血清サンプル中の抗原濃度推定のための標準調製物として使用した。適用した粗標準調製物（bulk standard preparation）の濃度を、２８０ｎｍでの吸光度を用いて測定した。一連の抗原希釈物を標準曲線をうるために使用した。ｔｉｅ抗原濃度は０、１８、３６、７２、１４４、７２０および３６００μｇ／ｌであった。被覆された抗体／標識された抗体の４つの異なる対の標準曲線を図９に示す。
乳癌、卵巣癌および異なる種類の肺癌患者の血清サンプルを、非癌患者の血清サンプルと同様に前記方法を用いて選別した。肺で成長する新しい転移を有する患者は、この分析法において高い値を示した。安定した疾患にかかっている患者は、非癌患者と比べて類似した値を示した。２０名の非癌患者および新たに新しい転移を有する３名の癌患者の血清中において検出された抗原濃度を図１０に示す。ＳＣＬＣを有する患者から６つのサンプルをえ、各サンプルは１～２カ月の間隔があり、卵巣癌および骨盤転移を有する患者から５つのサンプルをえた。乳癌および新しい肺転移を有する患者からは２つのサンプルをえた。図１０において使用した被覆された抗体／標識された抗体の対は、標準曲線によればより良好な感度を有した３Ｃ４Ｃ７Ｇ６／１０Ｆ１１Ｇ６であった（＞５μｇ／ｌ）。

【図１】

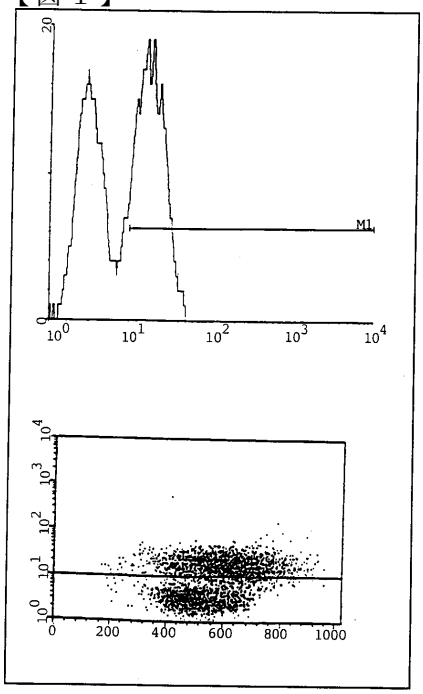


Fig. 1

【図２】

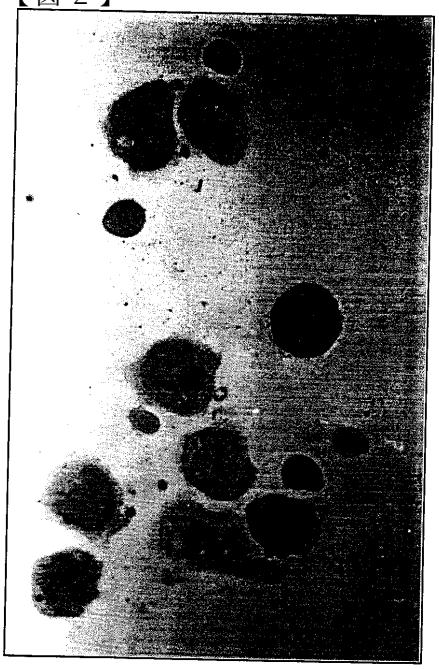


Fig. 2

【図３】

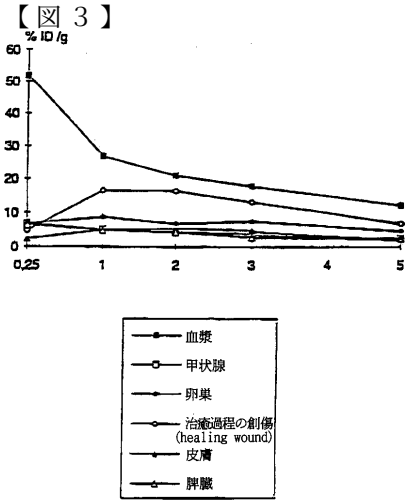


Fig. 3

【図４】

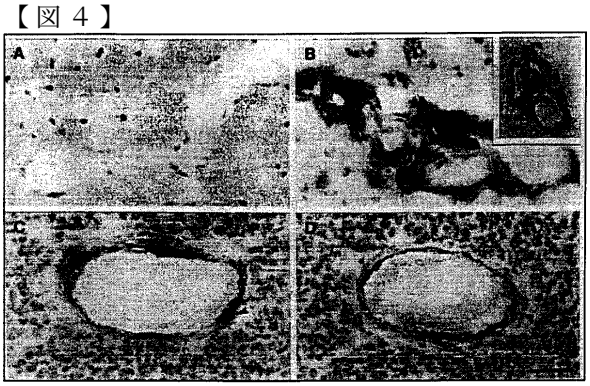
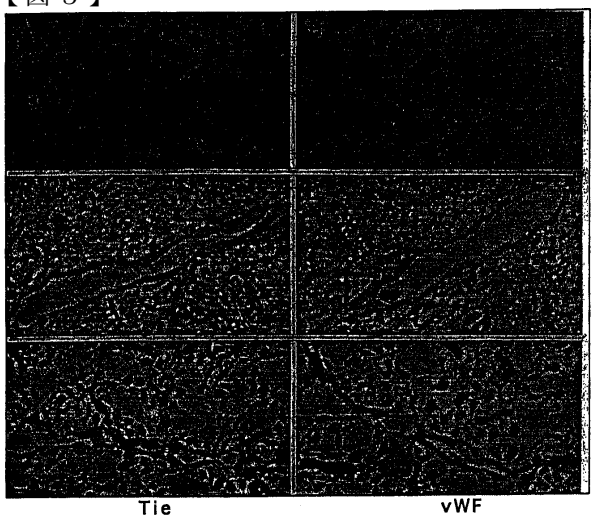


Fig. 4

【図５】



A-B: 血管芽腫
C-D: 血管周囲細胞腫
E-F: ゆるやかな構造の血管周囲細胞腫

Fig. 5

【図６】

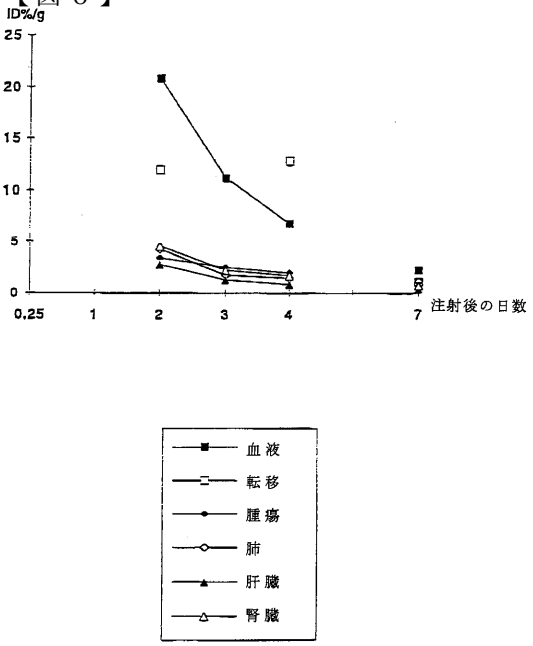


Fig. 6

【図７】

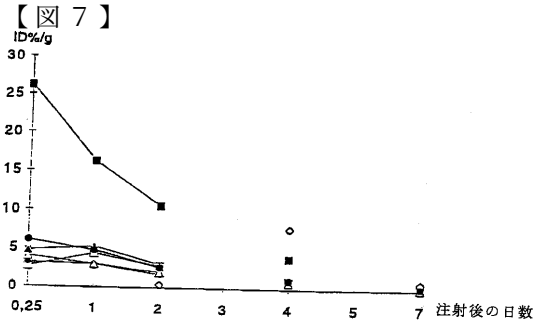


Fig. 7

【図８】

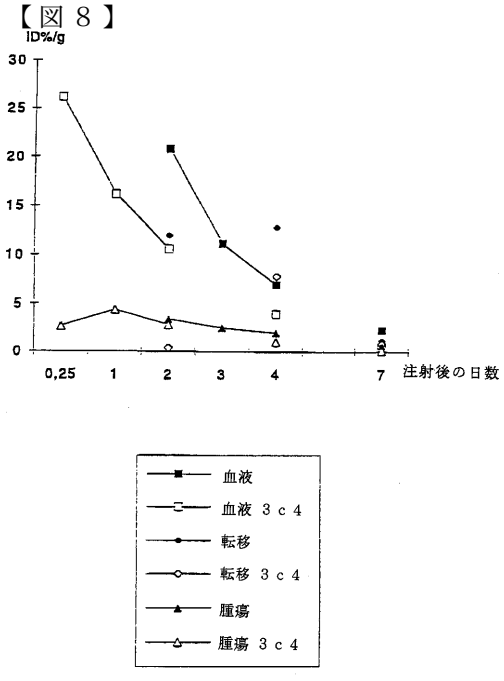


Fig. 8

【図９】

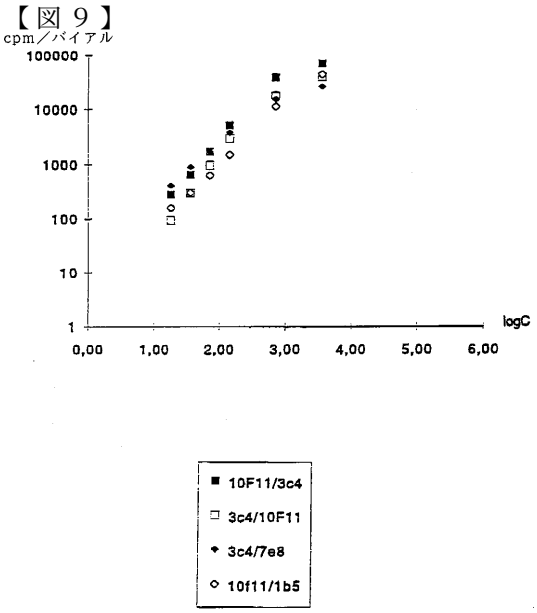


Fig. 9

【図１０】

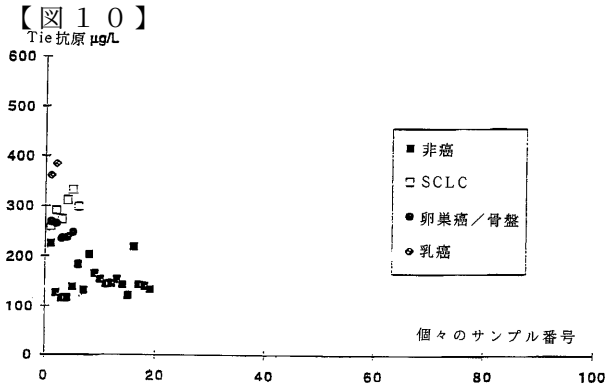


Fig. 10

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]		FI		
	G01N 33/573		G01N 33/574	Z
	G01N 33/574		G01N 33/577	B
	G01N 33/577		C12N 5/00	B
//	C12P 21/08		C12P 21/08	
	(C12N 5/10		C12N 5/00	B
	C12R 1:91)		C12R 1:91	
	(C12P 21/08		C12P 21/08	
	C12R 1:91)		C12R 1:91	

(72)発明者 アリタロ、カリ
フィンランド共和国、フィン－００２１０ エスポー、ニューリキンチエ ４ ア
(72)発明者 マチカイネン、マルヤーテルツ
フィンランド共和国、フィン－２３１００ ミュネメキ、ランキステンタンフア １２
(72)発明者 カルナニ、ペイヴィ
フィンランド共和国、フィン－２０３００ ツルク、ムリンチエ １０ ベー ６２

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 国際公開第９３／０１４１２４（WO, A1）
Molecular and Cellular Biology, １９９２年, Vol.23, No.4, p.1698-1707

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], ＤＢ名)
C12N 15/00 - 15/90
BIOSIS(DIALOG)
JICSTファイル(JOIS)
WPI(DIALOG)
PubMed