

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5431920号
(P5431920)

(45) 発行日 平成26年3月5日(2014.3.5)

(24) 登録日 平成25年12月13日(2013.12.13)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

C 0 7 K 16/28 Z N A

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 P 21/08

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 N

請求項の数 20 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-506889 (P2009-506889)
 (86) (22) 出願日 平成19年4月27日(2007.4.27)
 (65) 公表番号 特表2009-535021 (P2009-535021A)
 (43) 公表日 平成21年10月1日(2009.10.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/CH2007/000202
 (87) 国際公開番号 W02007/124610
 (87) 国際公開日 平成19年11月8日(2007.11.8)
 審査請求日 平成22年4月26日(2010.4.26)
 (31) 優先権主張番号 60/795,831
 (32) 優先日 平成18年4月28日(2006.4.28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 509322199
 デリネックス・セラピューティクス・アー
 ゲー
 スイス国 8952 シュリーレン, パー
 ギシュトラールセ 27
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100101373
 弁理士 竹内 茂雄
 (74) 代理人 100118902
 弁理士 山本 修
 (74) 代理人 100135415
 弁理士 中濱 明子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 受容体チロシンキナーゼ A L K の細胞外ドメインに結合する抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト未分化リンパ腫キナーゼ (A L K) タンパク質に結合する s c F v 抗体であって、
 配列番号 4 の可変重鎖 (V H) 配列、および
 配列番号 5 の可変軽鎖 (V L) 配列を含む、前記抗体。

【請求項 2】

請求項 1 の抗体であって、アミノ酸残基 391 ± 3 および 406 ± 3 (配列番号 91)
 に渡る領域の断片であるか、該領域を含むエピトープに結合する、前記抗体。

【請求項 3】

エピトープがアミノ酸 391 ~ 406 (配列番号 1) からなる、請求項 2 の抗体。

10

【請求項 4】

30 nM 以下の K_d によって特徴付けられる A L K エピトープペプチドに対するアフィ
 ニティーを有する、請求項 1、2 または 3 の抗体。

【請求項 5】

10 nM 以下の K_d によって特徴付けられる A L K エピトープペプチドに対するアフィ
 ニティーを有する、請求項 4 の抗体。

【請求項 6】

3 nM 未満の K_d によって特徴付けられる A L K エピトープペプチドに対するアフィ
 ニティーを有する、請求項 4 の抗体。

【請求項 7】

20

構造 $\text{NH}_2 - \text{VL} - \text{リンカー} - \text{VH} - \text{COOH}$ または $\text{NH}_2 - \text{VH} - \text{リンカー} - \text{VL} - \text{COOH}$ を含み、リンカーが配列番号 16 の配列を有する、請求項 1 から 6 のいずれか一項の抗体。

【請求項 8】

放射標識または毒素標識されている、請求項の 1 から 7 のいずれか一項の抗体。

【請求項 9】

薬剤または診断ツールとしての、請求項 1 から 8 のいずれか一項の抗体。

【請求項 10】

癌または腫瘍の治療用の薬剤の製造のための、請求項 1 から 9 のいずれか一項の抗体の使用。

10

【請求項 11】

薬剤が、ALK および / または ALK が仲介するシグナル伝達への MK および / または PTN 結合の阻害に適している、請求項 10 記載の使用。

【請求項 12】

薬剤が、抗癌剤と併用して、前記抗体を投与するのに適した併用薬剤である、請求項 10 または 11 の使用。

【請求項 13】

抗癌剤がメトトレキサートである、請求項 12 の使用。

【請求項 14】

治療が、神経芽細胞腫、神経膠芽腫、横紋筋肉腫、乳癌、黒色腫、膵臓癌、B 細胞 NHL、甲状腺癌、小細胞肺癌、網膜芽細胞腫、ユーイング肉腫、前立腺癌、結腸癌、脂肪腫、脂肪肉腫、線維肉腫の治療である、請求項 10 の使用。

20

【請求項 15】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項の抗体をコードする、DNA。

【請求項 16】

請求項 15 の DNA を含む、発現ベクター。

【請求項 17】

請求項 16 の発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 18】

大腸菌 (E. coli) 細胞である、請求項 17 の宿主細胞。

30

【請求項 19】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項の抗体の産生のための方法であって、前記抗体の合成を可能にする条件下で、請求項 17 または 18 の宿主細胞を培養し、そして前記培養から該抗体を回収する工程を含む、前記方法。

【請求項 20】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項の抗体を含有する薬剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連情報

40

本出願は、2006 年 4 月 28 日に出願された米国仮特許出願第 60 / 795,831 号に優先権を請求し、該出願の全内容は本明細書に援用される。

【0002】

本明細書全体で引用されるいかなる特許、特許出願、および参考文献の内容も、その全体が本明細書に援用される。

技術分野

本発明は、ヒト ALK (未分化リンパ腫キナーゼ) に特異的な抗体、特に scFv、該抗体をコードする核酸配列、その産生、および薬剤としてのまたは診断目的のためのその使用に関する。前記抗体は、腫瘍または癌、特に神経膠芽腫の局所治療に適している。

【背景技術】

50

【 0 0 0 3 】

背景技術

A L K (未分化リンパ腫キナーゼ ; C D 2 4 6) は、受容体チロシンキナーゼ (R T K) ファミリーのメンバーである。このファミリーの典型的なメンバーとして、該キナーゼは、3つのドメイン : 1つのL D L受容体クラスAドメインおよび2つのM A Mドメイン (M A M : メプリン、A 5 抗原、タンパク質チロシンホスファターゼ μ) を含有する細胞外リガンド結合性ドメイン (a a 1 9 ~ 1 0 3 8)、膜貫通ドメイン (a a 1 0 3 9 ~ 1 0 5 9)、ならびにチロシンキナーゼドメインを含有する細胞質ドメイン (a a 1 0 6 0 ~ 1 6 2 0) から本質的になる、I型膜貫通タンパク質である。シグナルペプチドは、新生タンパク質のN末端に存在し (a a 1 ~ 1 8)、分泌に際して切断される。

10

【 0 0 0 4 】

全長ヒトおよびマウスA L Kは、2つの独立のグループによって、1997年にクローニングされた (I w a h a r a 1 9 9 7 ; M o r r i s 1 9 9 7)。A L Kは白血球チロシンキナーゼ (L T K) と呼ばれるR T Kに非常に類似であり、そしてインスリン受容体スーパーファミリーに属する。A L Kは、重複領域において、L T Kと57%のa a同一性および71%のa a類似性を示す (M o r r i s 2 0 0 1)。A L Kは非常にNグリコシル化され、そして21の推定上のNグリコシル化部位を含有する。アミノ酸687 ~ 1034は、L T Kに有意な類似性 (50%のa a同一性) を有する。しかし、N末端近位686 a a配列は、L D L受容体にも見られる非常に短い配列を例外として、いかなる既知のタンパク質にも相同性をまったく示さない (D u y s t e r 2 0 0 1 / S W I S S P R O T)。さらに、A L Kは、a a 2 6 4 ~ 4 2 7およびa a 4 7 8 ~ 6 3 6に2つのM A Mドメインを含有する (メプリン、A 5 抗原、タンパク質チロシンホスファターゼ μ)。これらのドメインは、細胞間相互作用に関連づけられる多様な接着性タンパク質の間に広く行き渡っているため、該ドメインは接着機能を有すると考えられる (D e J u a n 2 0 0 2)。さらに、アミノ酸396 ~ 406に対応する、A L Kの推定上のリガンドの結合性部位がある (S t o i c a 2 0 0 1 ; 以下を参照されたい)。ネズミA L Kのキナーゼドメインのアミノ酸配列は、ヒトA L Kに98%のa a同一性、マウスL T Kに78%の同一性、マウスr o sに52%、ヒト・インスリン様増殖因子受容体に47%、そしてヒト・インスリン受容体に46%の同一性を示す (I w a h a r a 1 9 9 7 ; L a d a n y i 2 0 0 0)。A L Kのスプライス変異体は、現在まで記載されてきていない。しかし、A L Kはしばしば、染色体転位置と関連づけられる (以下を参照されたい)。

20

30

【 0 0 0 5 】

A L K遺伝子は、約315 k bに渡り、そして26エクソンを有する。該遺伝子の大部分は、約170 k bに渡る2つの巨大イントロンからなる。A L K転写物は、長さ6.5 k bである (K u t o k 2 0 0 2)。M o r r i sによると、c D N Aは6226 b pに渡る (M o r r i s 2 0 0 1)。

【 0 0 0 6 】

マウスにおけるA L K発現は、発生段階E 1 1前後の胚形成中に開始し、そして発生の新生児期において持続し、この際、神経系で発現される。成体においては、生理学的発現は、低レベルで、C N Sの特定の神経 (神経細胞およびグリア細胞、ならびにおそらく内皮細胞) 領域に限定される (M o r r i s 1 9 9 7 ; D u y s t e r 2 0 0 1 ; S t o i c a 2 0 0 1)。実際、A L Kの存在量は出生後の期間に減少する (M o r r i s 2 0 0 1)。その発現パターンに基づいて、脳発生において受容体が役割を果たすことが示唆されている (D u y s t e r 2 0 0 1)。A L Kの発現が神経に限定されることから、A L Kが神経栄養因子の受容体として働くことが示唆される (以下を参照されたい)。これと一致して、A L Kの発現パターンは、ニューロトロフィン受容体のT R Kファミリーをコードする遺伝子と重なる (M o r r i s 2 0 0 1)。しかし、A L Kノックアウトマウスは、いかなる明らかな表現型も示さず (未公表データ)、これはT R Kファミリーメンバーまたは他のニューロトロフィン受容体との何らかの機能的冗長性のた

40

50

めである可能性もある。特に、造血組織は、ALKの検出可能な発現をまったく示さない（以後を参照されたい）（Morris 2001）。

【0007】

ALKの2つの潜在的なリガンド、「プレイオトロフィン」（PTN）および「ミッドカイン」（MK）が、近年、記載されている（Stoica 2001; Duyster 2001; Stoica 2000）。精製ヒト・プレイオトロフィンタンパク質を用いて、ファージディスプレイペプチドライブラリーをスクリーニングすることによって、PTN-ALK相互作用が同定された。この方法によって、細胞外ドメインに存在するALKの配列（aa 396~406）が同定された。重要なことに、この配列は、ALKに最も緊密に関連するRTKであるLTKとは共有されない。このリガンド結合性領域はまた、ショウジョウバエ（Drosophila）におけるALKの潜在的な相同体でも保存されている（Loren 2001）。ALKは、PTN結合に際して、迅速にリン酸化される（Bowden 2002）。さらに、ALKは、細胞培養において、プレイオトロフィンによって刺激されることが示されてきている。このことから、プレイオトロフィンが有する病理学的関与を踏まえると、プレイオトロフィン/ALK相互作用は、特に興味深いものとなる（Stoica 2001）。ALK発現を欠く細胞株はまた、プレイオトロフィンに対する増殖応答を示すことができず、そして逆もまた当てはまる（Stoica 2001）。in vivoでは、多様な固形腫瘍を患う患者血清において、プレイオトロフィンレベルが上昇していることが立証されてきており、そして動物研究によって、プレイオトロフィンが腫瘍増殖に寄与することが示唆されてきている（Stoica 2001）。腫瘍増殖における律速血管新生因子としてのPTNの役割が動物モデルにおいてよく確立されている（Choudhuri 1997）。1996年、Czubaykoら（Czubayko 1996）は、リボザイム・ターゲティング・アプローチを用いてPTNレベルを調節することによって、腫瘍血管新生、アポトーシス防止および転移において、PTNが重要であることを立証した。マウスにおけるPTNの血清レベル測定は、腫瘍サイズと明らかな相関を示した。PTNは、黒色腫および膵臓癌などの最も侵襲性が高いヒト癌タイプのいくつかで、重要な役割を果たし、したがって、ALK阻害剤の潜在的なさらなる適用に関して、興味深い観点を提供する（Weber 2000; Stoica 2001）。ヒト患者において、膵臓癌（n=41; $P<.0001$ ）および結腸癌（n=65; $P=.0079$ ）患者で、血清プレイオトロフィンレベルの上昇が見られた。健康な個体において、PTNは、周産期臓器発生中に、そして成体中のニューロンおよびグリアの選択された集団において、非常に制御された方式で発現される。

【0008】

いくつかの癌細胞株に見られるように、PTNおよびALKの同時発現によって、これらが増殖刺激の自己分泌ループを形成可能であることが示される（Stoica 2001）。これらのデータすべてに関わらず、文献によれば、PTNの効果がALKのみによっておよび/または他の同定されていないPTN受容体によって仲介されるのか、未だ明らかでない（Duyster 2001）。PTNの少なくとも2つの他の潜在的な受容体が発見されてきている：受容体チロシンホスファターゼRPTP およびヘパラン硫酸プロテオグリカンN-シンデカン。しかし、RPTP は、PTN/ALKシグナル伝達のシグナル伝達調節剤として、そしてN-シンデカンはリガンドのシャペロンとして、作用する可能性もある（Bowden 2002）。

【0009】

近年、ミッドカイン（MK）と呼ばれる、プレイオトロフィンに関連する別の分泌増殖因子が、ALKの第二のリガンドとして同定されてきた。PTN同様、ALK-ECDに対して作製された同じ抗体によって、MKの結合および活性化機能（例えば細胞培養における軟寒天コロニー形成の誘導）を遮断可能である（Stoica 2001）。プレイオトロフィン同様、ミッドカインは多くの腫瘍で上方制御されているが、成体正常組織においては、その生理学的発現は非常に制限されている（Stoica 2002）。47

10

20

30

40

50

の膀胱腫瘍試料を分析すると、正常膀胱組織と比較して、MK発現が有意に（約4倍）増進していることが明らかになった。さらに、顕著な過剰発現は、劣った患者生存と相関する（O'Brien 1996）。

【0010】

しかし、ALKに対するMKのアフィニティーは、プレイオトロフィンのものより約5倍低い（Stoica 2002）。興味深いことに、プレイオトロフィン同様、リボザイムを介したALKの阻害はまた、細胞培養において、MKの効果を阻害する（Stoica 2002）。これらの研究の著者らはまた、そのうちいくつかは、例えば神経膠芽腫および膵臓癌などの、これまで非常に限定された治療オプションしか持たない、多様な疾患の治療に、PTK/MK/ALK経路の阻害が、非常に魅力的な可能性を開くと結論づけている（Stoica 2002）。

10

【0011】

健康な個体において、ALK mRNA発現は、新生児期中にピークに到達し、そして神経系のいくつかの選択される部分において、成体で持続する。近年、ALKタンパク質の発現はまた、神経細胞およびグリア細胞に関連する内皮細胞においても検出された。プレイオトロフィンに関して記載される悪性活性の少なくとも一部が、ALKを通じて仲介される証拠は、リボザイム・ターゲティング・アプローチによってALK発現が枯渇した実験から得られた。こうしたALK枯渇は、プレイオトロフィンが刺激する抗アポトーシスタンパク質Aktのリン酸化を防止し、そして異種移植片を移植されたマウスの生存の延長を導いた。実際、ALK発現を枯渇させると、腫瘍移植片中のアポトーシス細胞の数は、有意に増加した（Powers 2002）。

20

【0012】

MKに関して記載される悪性活性が、ALKを通じて仲介される証拠は、ALK ECDに対して向けられるモノクローナル抗体を用いた実験から得られた。2つの抗ALK ECD抗体由来のハイブリドーマ細胞上清の1:25希釈を添加すると、軟寒天中のSW-13細胞のコロニー形成が有意に減少する（Stoica 2002）。10の異なる細胞株を分析すると、PTNに対する増殖応答に関する能力は、ALK mRNAの発現と完全に相関することが明らかになった（以下の細胞株がPTNに応答し、そしてALK mRNAを発現することが見いだされた：HUVEC、NIH3T3、SW-13、Colo357、ME-180、U87、MD-MB 231；Stoica 2001）。興味深いことに、いくつかの癌細胞株（Colo357膵臓癌、Hs578T乳癌およびU87神経膠芽腫）において、PTNおよびALKは同時発現されており、これによって、PTNおよびALKが増殖刺激の自己分泌ループを形成することが示される（Stoica 2001）。

30

【0013】

興味深いことに、PTNおよびMKはどちらも、抗アポトーシスbcl-2タンパク質の転写上方制御を引き起こすことが示されてきている（Stoica 2002）。さらに、活性化されたAkt（異常なALKシグナル伝達の決定的な下流ターゲット）は、badと呼ばれるアポトーシス促進性因子をリン酸化し、こうしてbcl-x1からの解離を導き、bcl-x1は、badから解放されると、チトクロムcの遊離を遮断することによって、アポトーシスを抑制可能である（参考文献として、Bowden 2002を参照されたい）。

40

【0014】

ALKの異常な発現は、いくつかの癌の発展に関与する可能性もある。しかし、これはまず、非常に悪性の非ホジキンリンパ腫（NHL）のサブグループ、いわゆる未分化大細胞リンパ腫（ALCL）と関連づけられた。非ホジキンリンパ腫は、リンパ系起源の多様な細胞から生じるクローン性新生組織形成に相当する。

【0015】

ALCLの原発性全身性臨床的サブタイプの患者の大部分は、t(2;5)転位を有し、ALKのC末端にヌクレオフォスミン（NPM）のN末端を連結する融合タンパク質を発

50

現している。融合体は、ALKのaa 1058~1620に融合したNPMのaa 1~117からなり、そして染色体切断は、ALKのTMおよび膜近接ドメインをコードするエクソン間に位置するイントロン中に位置する(Duyster 2001)。NPM-ALKは、680aaタンパク質をコードする2040bpのORFを含有する転写物である(Morris 2001)。これは、911bpに渡るNPMのイントロン4および2094bpに渡るALKのイントロン16における切断に対応する(Kutok 2002)。この融合タンパク質中のALK配列がALLを導くタンパク質に必要な最小配列である可能性が最も高い(Duyster 2001)。逆融合体(ALK-NPM)は、少なくともリンパ系細胞では発現されない(Kutok 2002)。野生型NPMタンパク質は、偏在性の発現を示し、そして細胞質から核内へのタンパク質のキャリアーとして機能する。実際、NPMは、NLSを含有する、第5番染色体上にコードされる38kDa核タンパク質であり、核タンパク質に結合し、そして細胞質/核輸送に関与する(Duyster 2001)。NPMは、最も豊富な核タンパク質の1つであり、そして通常、六量体として存在する(Morris 2001)。最も重要なことに、NPMは、通常、自己オリゴマー化(六量体)ならびにNPM-ALKを伴うヘテロオリゴマー化を経る(Duyster 2001)。2;5転位置は、第2番染色体上のチロシンキナーゼをコードするALK遺伝子部分を、第5番染色体上の強いNPMプロモーターの制御下に置き、キメラNPM-ALKタンパク質(p80)の永続的な発現を生じる(Duyster 2001)。したがって、ALKキナーゼは、制御解除され、そして細胞タイプ(リンパ系)および細胞区画(核/仁および細胞質)の両方の意味で異所性である(Ladanyi 2000)。NPMの局在(細胞質または核)は、リンパ腫形成に対する効果に影響を及ぼさないようである(Duyster 2001)。生じた異常なチロシンキナーゼ活性は、細胞内ターゲットの恒常的なリン酸化を介して、悪性形質転換を誘発する。多様な他のより一般的でないALK融合タンパク質がALLに関連する。すべての変異体は、ALKチロシンキナーゼドメインの発現を制御する別のプロモーターへの該ドメインの連結を示す。

【0016】

全長ALKは、原発性神経芽細胞腫細胞の約92%で、そしていくつかの横紋筋肉腫でもまた発現されることが報告されてきている(Lamant 2000)。しかし、ALK発現および腫瘍生物学の間の相関はこれまでのところ立証されてきていない。この事実は、これらの腫瘍においてALKが有意なレベルで内因性にリン酸化されている証拠がないことと併せて、神経芽細胞腫におけるALK発現が、主要な発癌上の役割を反映するというよりも、未成熟な神経細胞におけるALKの通常の発現を反映し、そしてこれらの腫瘍においてはALKは恒常的にはリン酸化されておらず、したがってこれらの腫瘍においてALKが重要な役割を果たしているかどうかは疑問であることを示唆する(Duyster 2001; Pulford 2001)。にもかかわらず、神経芽細胞腫由来細胞株における、遺伝子増幅によるALKの過剰発現および恒常的リン酸化を発見したMiyakeらによって示唆されるように、ALKシグナル伝達は、少なくともいくつかの神経芽細胞腫においては重要である可能性もある(Miyake 2002)。しかし、他の神経芽細胞腫由来細胞株は、ALKの恒常的活性化を示さず、したがってALKの一般的な病理学的関与には相反する(Dirks 2002; Pulford 2004)。

【0017】

最も興味深いことに、ALKは、非常に限定された療法オプションしか提供しない非常に悪性の脳腫瘍である多形性膠芽腫の増殖に重要であるようである(Powers 2002)。これらの破壊的な腫瘍においては、多数の遺伝子改変が起こることが示されてきており、これにはPTEN、p53およびINK4a-ARFの喪失または突然変異が含まれる。さらに、RTKシグナル伝達は、PDGF、HGF、NGFおよびVEGFなどの多様な増殖因子を過剰発現する、これらの腫瘍の増殖および発展に特に重要な役割を果たし、このことから自己分泌RTKシグナル伝達ループが示唆される。Powersおよ

10

20

30

40

50

び同僚らは、神経膠芽腫患者腫瘍試料における、A L K の m R N A およびタンパク質発現を示したが、正常の隣接脳組織ではシグナルは検出不能であった (P o w e r s 2 0 0 2)。さらに、ヒト U 8 7 M G 神経膠芽腫細胞 (患者に由来し、そして神経膠芽腫における腫瘍形成およびシグナル伝達を研究するための、よく性質決定されたモデル系に相当する) は、異種移植片研究において、A L K に依存性の抗アポトーシスの振る舞いを示す。リボザイムの使用によって、これらの腫瘍細胞において A L K が枯渇すると、これらの腫瘍細胞を注射されたマウスは、野生型腫瘍細胞を注射された場合の少なくとも 2 倍長期間生存し、そしてこれらの腫瘍細胞は、アポトーシスの劇的な増加を示す。したがって、A L K およびそのリガンド (単数または複数) は、i n v i v o で、U 8 7 M G 細胞の腫瘍増殖に関して律速である、本質的な生存シグナルを提供する。これらの発見は、A L K シグナル伝達の阻害が、神経膠芽腫患者の平均余命を改善する有望なアプローチでありうることを示す。

10

【 0 0 1 8 】

多形性膠芽腫は、群を抜いて最も一般的であり、そして悪性である原発性グリア腫瘍であり、罹患率は約 2 / 1 0 0 , 0 0 0 / 年である (年あたり、米国および西ヨーロッパにおいて、約 1 5 , 0 0 0 症例)。該疾患は、優先的に大脳半球に影響を及ぼすが、脳幹 (主に小児) または脊髄にも影響を及ぼしうる。腫瘍は、新規に現れることもありうる (原発性神経膠芽腫) し、またはより低いグレードの星状神経腫から発展することもありうる (続発性神経膠芽腫)。原発性および続発性神経膠芽腫は、分子重複をほとんど示さず、そして分子レベルで異なる疾患実体を構成する。これらはどちらも、p 5 3、E G F R、M D M 2、P D G F、P T E N、p 1 6、R B の関与を含む、多くの遺伝子異常を含有する。

20

【 0 0 1 9 】

最近 2 5 年間で、大きな療法進歩は起こっていない。療法は、対症療法的でしかなく、そして平均余命を 3 ヶ月 ~ 1 年間延長させうる。患者は通常、緩慢な進行性神経学的欠陥、例えば運動麻痺、頭蓋内圧症候群、例えば頭痛、吐き気、嘔吐、認知障害、または癲癇を示す。人格の変化もまた、初期徴候でありうる。神経膠芽腫の病因は未知であり、家族性の症例は 1 % 未満に相当する。同定されている唯一の一貫したリスク要因は、石油化学製品への曝露である。診断は主に、画像研究 (C T、N M R) および生検によって行われる。大部分の神経膠芽腫は明らかに明示される縁を持たないため、これらの腫瘍を完全に病期決定するのは、実際的でなくまた可能でもない。むしろ、これらは、局所に浸潤し、そして緻密な白質経路に沿って広がる、よく知られる傾向を示す。治癒的な治療が不可能である主な理由は、腫瘍が診断された際には、局所の制御が到達する範囲を超えているためである。主な化学療法剤はカルムスチン (アルキル化剤) およびシスプラチンであるが、何らかの応答を示すのは患者の 4 0 % でしかない。

30

【 0 0 2 0 】

神経膠芽腫における A L K の役割に関してはかなりの不確実性があるが、この疾患は、A L K に向けられる薬剤に関して多様なアプローチを提供する。実際、この破壊的な疾患に関しては、現在の療法オプションのわずかな改善であってさえ、大きな医学的ニーズを提供するであろう。神経膠芽腫細胞は、全長 A L K を発現するため、この癌を治療するためには、A L K は、小分子キナーゼ阻害剤だけでなく、抗体および / または s c F v などの抗体断片のターゲットとも見なされ、すなわち腫瘍細胞のアポトーシスを誘導することも可能であることに注目することが重要である。神経膠芽腫は C N S に厳密に局在しているため、s c F v を C N S に効率的に送達可能であるならば、s c F v の使用が支持される (区画化されるため、迅速なクリアランスは起こらないが、サイズがより小さいため、I g G に比較して腫瘍浸透がより優れている)。抗体および / または抗体断片は、A L K のリガンド結合性配列 (a a 3 9 6 ~ 4 0 6) に対して、または受容体の細胞外部分の他の部分に対して向けられていてもよい。

40

【 0 0 2 1 】

生理学的条件下で、健康な組織においては A L K の発現が非常に制限されていることは

50

、A L Kがこれらの腫瘍の病因に関与しているかどうかに関わらず、A L Kを発現している腫瘍が、放射性または毒素標識抗体および/または抗体断片を用いて疾患を治療するために優れたターゲットでありうることを示す。神経膠芽腫細胞に加えて、A L K発現は、黒色腫細胞株および乳癌細胞株で非常に有意に見いだされている(恒常的にリン酸化されてはいない)(Dirks 2002)。A L Kの細胞外ドメインの大部分は、ヒト・プロテオーム中でかなりユニークであるようである事実から、このアプローチは非常に特異的であるはずである。

【0022】

WO9515331/US5529925は、ヒトt(2;5)リンパ腫において起こるt(2;5)(p23;q35)染色体転位置事象において再編成される、ヒト核酸配列のクローニングおよび配列決定を開示する。再編成は、染色体5q35上の仁リンタンパク質遺伝子(NPM遺伝子)由来の配列を、染色体2p23上の以前は同定されていなかったタンパク質チロシンキナーゼ遺伝子(以後、A L K遺伝子)由来の配列にもたらしることが見いだされた。融合遺伝子および融合タンパク質の配列(それぞれ、NPM/A L K融合遺伝子またはタンパク質)もまた開示された。

【0023】

全長A L K配列は、「ヒトA L Kタンパク質チロシンキナーゼ」と題されるUS5770421に特許される。さらに、「A L KまたはNPM遺伝子における切断点を伴う染色体再編成の検出法」と題される特許US6174674B1は、患者試料において、NPM-A L K融合配列を検出するためのプライマーを開示する。「A L Kタンパク質チロシンキナーゼ/その受容体およびリガンド」と題される別の特許出願、US6696548において、A L KリガンドおよびA L Kの特定の配列に結合する抗体を検出するためのA L Kの使用が開示される。該出願はまた、単離A L Kポリペプチドに結合可能な剤を同定する方法も開示する。WO0196394/US20020034768は、プレイオトロフィンの受容体としてのA L Kを開示する。US20040234519は抗プレイオトロフィン抗体を開示し、そしてWO2006020684はプレイオトロフィンの検出を記載する。

【発明の開示】

【0024】

発明の開示

したがって、in vitroおよびin vivoでヒトA L Kタンパク質に結合する、安定でそして可溶性である抗体または抗体誘導体を提供することが本発明の一般的な目的である。最も好ましくは、抗体はA L Kのリガンド結合性ドメイン(アミノ酸396~406)に対して特異的にターゲティングされ、そしてしたがって、A L Kに対して約170pMのKdを有するMKの生物学的効果、ならびにA L Kに対して約20~30pMのKdを有するPTNの生物学的効果の両方を遮断するであろう(Stoica 2002; Stoica 2001)。好ましい態様において、前記抗体または抗体断片は、scFv抗体またはFab断片である。以下において、用語、抗体は、全長抗体ならびに他の抗体誘導体を含む。

【0025】

ここで、本発明のこれらの目的、および説明が進むにつれてより容易に明らかになるであろうさらなる目的を実行するため、前記抗体は、配列番号2の配列に少なくとも50%の同一性を持つ配列の可変重鎖CDR3を含むという特徴によって明らかになる。好ましくは、配列同一性は、少なくとも60%、65%、75%、85%、またはより好ましくは少なくとも92%である。最も好ましくは、前記抗体は、配列番号2の配列のVH CDR3を有する。

【0026】

1つの態様において、本発明の抗体またはその抗原結合性部分は、A L Kタンパク質の特定のエピトープに特異的に結合する。こうしたエピトープは、例えば、A L Kタンパク質のアミノ酸1~50、50~100、100~150、150~200、200~25

10

20

30

40

50

0、250～300、300～350、350～400、400～450、450～500、500～550、550～600、600～650、650～700、700～750、750～800、800～900、900～1000、1000～1100、1100～1200、1200～1300、1300～1400、1400～1500、または1500～1620、あるいはその任意の区間、部分または範囲内に存在する。1つの態様において、抗体またはその抗原結合性部分は、A L Kタンパク質（配列番号1）のアミノ酸残基391±3および406±3（配列番号91は、ヒトA L Kタンパク質のアミノ酸残基388～409を示す）、好ましくはアミノ酸391～406（配列番号1）に渡る領域を含むか、該領域から本質的になるか、または該領域の断片であるエピトープに、特異的に結合する。示した範囲がはっきりした境界を有するとは見なされないものとし、抗体またはその抗原結合性部分が、A L Kのリガンド結合性ドメイン近傍に位置するかまたはそのドメイン内にある領域に結合するかまたは部分的に結合してもよいことが理解される。好ましくは、抗体または抗体誘導体は、長さ10～20アミノ酸のA L Kタンパク質エピトープに結合する。

10

【0027】

別の態様において、抗体またはその抗原結合性部分は、約 10×10^{-6} M未満の K_D でA L Kタンパク質に特異的に結合すると特徴付け可能である。特定の態様において、抗体またはその抗原結合性部分は、少なくとも約 10×10^{-7} M、少なくとも約 10×10^{-8} M、少なくとも約 10×10^{-9} M、少なくとも約 10×10^{-10} M、少なくとも約 10×10^{-11} M、または少なくとも約 10×10^{-12} Mの K_D 、あるいはさら

20

【0028】

多様な他の態様において、抗体またはその抗原結合性部分には、配列番号4に示すような可変重鎖領域アミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、またはより好ましくは少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む可変重鎖領域が含まれる。

【0029】

他の態様において、抗体またはその抗原結合性部分には、配列番号5に示すような可変軽鎖領域アミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、またはより好ましくは少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む可変軽鎖領域が含まれる。

30

【0030】

さらに他の態様において、抗体またはその抗原結合性部分には、配列番号4に示すような可変重鎖領域アミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、またはより好ましくは少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む可変重鎖領域、および配列番号5に示すような可変軽鎖アミノ酸配列に、少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、またはより好ましくは少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む可変軽鎖領域の両方が含まれる。

【0031】

特定の他の態様において、抗体またはその抗原結合性部分は、E S B A 5 2 1（配列番号19）の抗体または抗体誘導体が結合するエピトープと重複するエピトープに特異的に結合し、そして/またはE S B A 5 2 1の抗体または抗体誘導体と、A L Kタンパク質またはその一部への結合に関して競合する。関連する態様において、抗体またはその抗原結合性部分は、A L Kタンパク質の残基391～406（配列番号1）またはその一部を含むエピトープに特異的に結合する。

40

【0032】

抗体またはその抗原結合性部分の可変重鎖および軽鎖領域には、典型的には、1以上の相補性決定領域（CDR）が含まれる。これらには、CDR1、CDR2、およびCDR3領域が含まれる。特定の態様において、可変重鎖CDRは、E S B A 5 2 1抗体のCDRに、少なくとも80%、85%、90%、95%、またはより好ましくは100%同一

50

である。他の特定の態様において、可変軽鎖CDRは、ESBA521抗体の可変軽鎖領域のCDRに、少なくとも80%、85%、90%、95%、またはより好ましくは100%同一である。

【0033】

したがって、本発明の特定の抗体または断片は、ESBA521の可変重鎖領域のCDRに、少なくとも80%、85%、90%、95%、またはより好ましくは100%同一である1以上の相補性決定領域(CDR)が含まれる可変重鎖領域、およびESBA521抗体の可変軽鎖領域のCDRに、少なくとも80%、85%、90%、95%、またはより好ましくは100%同一である1以上のCDRが含まれる可変軽鎖領域を含む。

【0034】

抗体またはその抗原結合性部分の可変重鎖領域にはまた、ESBA521抗体の可変重鎖領域のCDRに、少なくとも80%、85%、90%、95%、またはより好ましくは100%同一である3つのCDRすべて、および/またはESBA521抗体の可変軽鎖領域のCDRに、少なくとも80%、85%、90%、95%、またはより好ましくは100%同一である3つのCDRすべても含まれてもよい。

【0035】

本発明の別の態様において、抗体またはその抗原結合性部分には(a)ヒトVH遺伝子(例えばH3型)にコードされるかまたは由来する(すなわちその産物である)重鎖可変領域が含まれ;そして/または(b)ヒトV kappaまたはラムダ遺伝子(例えばラムダ1型)にコードされるかまたは由来する軽鎖可変領域が含まれる。

【0036】

本発明の抗体には、エフェクタードメイン(例えばFcドメイン)を含む、全長抗体、例えばモノクローナル抗体とともに、一本鎖抗体およびFab断片などの抗体部分または断片が含まれる。抗体はまた、多様な療法剤(例えば抗癌剤、化学療法剤、または毒素)および/または標識(例えば放射標識)に連結されていてもよい。

【0037】

別の側面において、本発明は、配列番号22に、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、またはより好ましくは少なくとも99%同一である抗体重鎖可変領域をコードする配列を含む単離核酸を特徴とする。本発明はまた、配列番号21に、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、またはより好ましくは少なくとも99%同一である抗体軽鎖可変領域をコードする配列を含む単離核酸も特徴とする。

【0038】

本発明はまた、単独でまたは組み合わせて(例えば1以上のベクターから発現される)のいずれかで、前述の核酸のいずれかを含む発現ベクター、ならびにこうした発現ベクターを含む宿主細胞も特徴とする。

【0039】

本発明の抗体を発現するのに適した宿主細胞には、多様な真核細胞、例えば酵母細胞、哺乳動物細胞、例えばチャイニーハムスター卵巣(CHO)細胞、NS0細胞、骨髓腫細胞、または植物細胞が含まれる。本発明の分子はまた、原核細胞、例えば大腸菌(E. coli)で発現されてもよい。

【0040】

本発明はまた、宿主細胞において、抗体をコードする核酸を発現させることによって、抗体またはその抗原結合性部分を作製するための方法も特徴とする(例えば抗体の抗原結合性領域部分をコードする核酸)。さらに別の側面において、本発明は、前述の核酸を含むハイブリドーマまたはトランスフェクトーマを特徴とする。

【0041】

別の態様において、本発明は、ALKタンパク質の、好ましくはPTNリガンド結合性ドメインのエピトープ、より好ましくはアミノ酸残基391±3および406±3(ヒトALKタンパク質のアミノ酸残基388~409を示す配列番号91を参照されたい)、最も好ましくはアミノ酸391~406(配列番号1)に渡る領域を含むか、該領域から

10

20

30

40

50

本質的になる断片、または該領域の断片を含む抗原を提供する。抗 A L K 抗体を作製するか、スクリーニングするか、または該抗体の存在を検出するために抗原を用いてもよいし、あるいは能動免疫療法における剤として、すなわちワクチンとして用いてもよい。

【 0 0 4 2 】

ワクチンとして、抗原を単独で、あるいは適切なアジュバントまたはハプテンと組み合わせて、例えば化学的にまたは遺伝子的にのいずれかで混合するかまたはコンジュゲート化してもよい。また、能動免疫療法に用いた場合、例えば本明細書に開示する抗 A L K 抗体のいずれかを用了受動免疫療法と組み合わせて、あるいは抗 A L K 抗体のモノクローナルまたはポリクローナル調製物、例えば血清陽性ドナー由来の血清ガンマグロブリンと組み合わせて、抗原を用いてもよい。

10

【 0 0 4 3 】

別の態様において、抗体分子（または V L および V H 結合性領域）は完全にヒトである。ヒト・モノクローナル抗体でヒトを治療すると、いくつかの利点が提供される。例えば、抗体は、非ヒト抗体よりも、ヒトにおいてより免疫原性でない可能性がある。抗体が癌部位（A L K が発現される箇所）に到達すると直ちに A L K 不活性化が起こりうるため、療法はまた、迅速でもある。したがって、関連態様において、抗体は、s c F v 抗体、すなわち E S B A 5 2 1、あるいは E S B A 5 2 1 の V L および / または V H 領域（単数または複数）（またはその C D R ; 例えば V L C D R 3（配列番号 3）および / または V H C D R 3（配列番号 2））を含む抗体である。

【 0 0 4 4 】

20

ヒト抗体はまた、非ヒト抗体よりもより効率的に、ヒトにおいて適切な部位に局在する。さらに、治療は A L K に特異的であり、組換え体であり、そして非常に精製され、そして伝統的な療法と異なって、外来性の病原体が混入する潜在的可能性を回避する。あるいは、本発明の抗体および抗体誘導体は、化学合成によって産生可能である。

【 0 0 4 5 】

別の態様において、本発明は、ミッドカイン（M K）および / またはブレイオトロフィン（P T N）などの A L K のリガンドと競合し、そしてそれによってこうしたリガンドが仲介する A L K シグナル伝達を遮断することによって、被験体において、新生物を防止しうる、癌を治療するための組成物（またはこうして適合する薬剤の作製）を提供する。こうした組成物を、単独でまたは当該技術分野に認識される抗癌剤、例えばメトトレキサート等と組み合わせて投与してもよい。

30

【 0 0 4 6 】

本発明の抗体および / または A L K ワクチンを単独で、または既知の療法剤、例えば抗癌剤、例えばメトトレキサート等と組み合わせて用いてもよい。

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明から、そして請求項から明らかであろう。

【 0 0 4 7 】

本発明は、以下の詳細な説明を考慮すると、よりよく理解され、そして上記のもの以外の目的が明らかになるであろう。こうした説明は、付属の図に言及する。

発明の詳細な説明

40

本発明がより容易に理解されうるように、特定の用語をまず定義する。

【 0 0 4 8 】

定義

用語「A L K」および「A l k - 1」には、膜貫通タンパク質チロシンキナーゼ（P T K） / 受容体である、A L K（未分化リンパ腫キナーゼ）遺伝子にコードされるヒト A L K タンパク質が含まれる。

【 0 0 4 9 】

用語「抗体」は、完全抗体およびその任意の抗原結合性断片（すなわち、「抗原結合性部分」、「抗原結合性ポリペプチド」、または「免疫結合剤」）または一本鎖を指す。「抗体」は、ジスルフィド結合によって相互連結された少なくとも 2 つの重（H）鎖および

50

2つの軽(L)鎖を含む糖タンパク質、またはその抗原結合性部分を指す。各重鎖は、重鎖可変領域(本明細書において、 V_H と略される)および重鎖定常領域で構成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン、 $CH1$ 、 $CH2$ および $CH3$ で構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書において、 V_L と略される)および軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、 CL で構成される。 V_H および V_L 領域をさらに、フレームワーク領域(FR)と称される、より保存された領域が組み入れられた、相補性決定領域(CDR)と称される超可変性領域に分けてもよい。各 V_H および V_L は、3つの CDR および4つの FR で構成され、アミノ末端からカルボキシ末端に、以下の順序で配置される: $FR1$ 、 $CDR1$ 、 $FR2$ 、 $CDR2$ 、 $FR3$ 、 $CDR3$ 、 $FR4$ 。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合性ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系の多様な細胞(例えばエフェクター細胞)および古典的補体系の第一構成要素($C1q$)を含む宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を仲介しうる。

【0050】

用語、抗体の「抗原結合性部分」(または単に「抗体部分」)は、抗原(例えば ALK)に特異的に結合する能力を保持する、抗体の1以上の断片を指す。全長抗体の断片によって、抗体の抗原結合機能を実行可能であることが示されてきている。用語、抗体の「抗原結合性部分」内に含まれる結合性断片の例には、(i) V_L 、 V_H 、 CL および $CH1$ ドメインからなる一価断片である Fab 断片;(ii)ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つの Fab 断片を含む二価断片である $F(ab')_2$ 断片;(iii) V_H および $CH1$ ドメインからなる Fd 断片;(iv)抗体の単一アームの V_L および V_H ドメインからなる Fv 断片;(v) V_H ドメインからなる一本鎖ドメインまたは dAb 断片(Wardら、(1989)Nature 341:544-546);および(vi)単離相補性決定領域(CDR)または(vii)場合によって合成リンカーによって連結されてもよい、2以上の単離 CDR の組み合わせが含まれる。さらに、 Fv 断片の2つのドメイン、 V_L および V_H は、別個の遺伝子によってコードされるが、組換え法を用いて、 V_L および V_H 領域が対形成して一価分子を形成する単一タンパク質鎖として作製されることを可能にする合成リンカーによって、これらを連結してもよい(一本鎖 $Fv(scFv)$ として知られる;例えばBirdら(1988)Science 242:423-426;およびHoustonら(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照されたい)。こうした一本鎖抗体もまた、用語、抗体の「抗原結合性部分」内に含まれると意図される。当業者に知られる慣用的技術を用いてこれらの抗体断片を得て、そして損なわれていない(intact)抗体と同じ方式で、有用性に関して断片をスクリーニングする。組換えDNA技術によって、あるいは損なわれていない免疫グロブリンの酵素的または化学的切断によって、抗原結合性部分を産生してもよい。抗体は、異なるアイソタイプ、例えばIgG(例えばIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4サブタイプ)、IgA1、IgA2、IgD、IgE、またはIgM抗体のものであってもよい。

【0051】

用語「フレームワーク」は、より多様な CDR 領域間に存在する、抗体可変領域の当該技術分野に認識される部分を指す。こうしたフレームワーク領域は、典型的には、フレームワーク1~4($FR1$ 、 $FR2$ 、 $FR3$ 、および $FR4$)と称され、そして CDR が抗原結合性表面を形成しうるように、三次元空間中に、重鎖または軽鎖抗体可変領域中に見られる3つの CDR を保持するための骨格を提供する。こうしたフレームワークはまた、より多様な CDR の提示のための支持体を提供するため、骨格とも称されうる。アンキリン・リピートおよびフィブロネクチンなどの、免疫グロブリンスーパーファミリーの他の CDR およびフレームワークを、抗原結合性分子として用いてもよい(例えば、米国特許第6,300,064号、6,815,540号、および米国公報第20040132028号もまた参照されたい)。

【0052】

用語「エピトープ」または「抗原性決定基」は、免疫グロブリンまたは抗体が特異的に

10

20

30

40

50

結合する抗原上の部位を指す（例えばA L K、例えばヒトA L K - 1のアミノ酸残基391～406（例えば配列番号1を参照されたい））。エピトープには、典型的には、ユニークな空間コンホメーションにある、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15アミノ酸が含まれる。例えば、E p i t o p e M a p p i n g P r o t o c o l s i n M e t h o d s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , V o l . 6 6 , G . E . M o r r i s 監修（1996）を参照されたい。

【0053】

用語「特異的結合性」、「選択的結合性」、「選択的に結合する」および「特異的に結合する」は、あらかじめ決定された抗原上のエピトープへの抗体結合を指す。典型的には、抗体は、およそ 10^{-7} M未満、例えば、およそ 10^{-8} M、 10^{-9} Mまたは 10^{-10} M未満あるいはそれよりさらに低い数値のアフィニティー（ K_D ）で結合する。

10

【0054】

用語「 K_D 」は、特定の抗体 - 抗原相互作用の解離平衡定数を指す。典型的には、本発明の抗体は、例えばB I A C O R E 装置において、表面プラズモン共鳴（S P R）技術を用いて決定されるように、およそ 10^{-7} M未満、例えば、およそ 10^{-8} M、 10^{-9} Mまたは 10^{-10} M未満あるいはそれよりさらに低い解離平衡定数（ K_D ）で、A L Kに結合する。

【0055】

用語「A L Kを中和する」、「A L Kを阻害する」、および「A L Kを遮断する」は、交換可能に用いられ、A L Kが1以上のターゲットリガンドと相互作用し、そして例えばシグナル伝達を誘発するのを、本発明の抗体が防止する能力を指す。

20

【0056】

用語「核酸分子」は、DNA分子およびRNA分子を指す。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であってもよいが、好ましくは二本鎖DNAである。核酸は、別の核酸配列と機能する関係に配置されている場合、「機能可能であるように連結されている」。例えば、プロモーターまたはエンハンサーは、コード配列の転写に影響を及ぼすならば、該配列に機能可能であるように連結されている。

【0057】

核酸に関しては、用語「実質的相同性」は、2つの核酸、またはその示される配列が、最適に並列され、そして比較された際、適切なヌクレオチド挿入または欠失を伴って、ヌクレオチドの少なくとも約80%、通常、ヌクレオチドの少なくとも約90%～95%、そしてより好ましくは少なくとも約98%～99.5%で、同一であることを示す。あるいは、選択的ハイブリダイゼーション条件下で、セグメントが鎖の相補体にハイブリダイズする場合、実質的相同性が存在する。こうしたハイブリダイゼーション条件は、当該技術分野に知られ、そして例えばS a m b o o kら、下記に記載される。

30

【0058】

2つの配列間の同一性パーセントは、2つの配列を最適に並列させるために導入する必要があるギャップの数、および各ギャップの長さを考慮に入れた、配列によって共有される同一位の数関数である。以下の限定されない実施例に記載するように、数学的アルゴリズムを用いて、配列比較および2つの配列間の同一性パーセントの決定を達成してもよい。

40

【0059】

N W S g a p d n a、C M Pマトリックス、ならびに40、50、60、70、または80のギャップ加重、および1、2、3、4、5、または6の長さ加重を用い、G C Gソフトウェアパッケージ中のG A Pプログラムを用いて、2つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントを決定してもよい。また、P A M 1 2 0 加重残基表、12のギャップ長ペナルティおよび4のギャップペナルティを用い、A L I G Nプログラム（バージョン2.0）に組み入れられている、E . M e y e r sおよびW . M i l l e r（C A B I O S , 4 : 1 1 - 1 7（1989））のアルゴリズムを用いて、2つのヌクレオチドまたは

50

アミノ酸配列間の同一性パーセントを決定してもよい。さらに、B l o s s u m 62マトリックスまたはP A M 250マトリックスのいずれか、ならびに16、14、12、10、8、6、または4のギャップ加重および1、2、3、4、5、または6の長さ加重を用い、G C Gソフトウェアパッケージ中のG A Pプログラムに組み入れられている、N e e d l e m a nおよびW u n s c h (J . M o l . B i o l . (48) : 444 - 453 (1970)) アルゴリズムを用いて、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントを決定してもよい。

【0060】

さらに、本発明の核酸およびタンパク質配列を「クエリー配列」として用いて、公的データベースに対して検索を実行して、例えば関連配列を同定してもよい。A l t s c h u l r a (1990) J . M o l . B i o l . 215 : 403 - 10のN B L A S TおよびX B L A S Tプログラム(バージョン2.0)を用いて、こうした検索を実行してもよい。N B L A S Tプログラム、スコア = 100、ワード長 = 12でB L A S Tヌクレオチド検索を実行して、本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得てもよい。X B L A S Tプログラム、スコア = 50、ワード長 = 3でB L A S Tタンパク質検索を実行して、本発明のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得てもよい。比較目的のためのギャップを挿入した並列を得るため、A l t s c h u l r a (1997) N u c l e i c A c i d s R e s . 25 (17) : 3389 - 3402に記載されるようなギャップ化B L A S Tを利用してもよい。B L A S Tおよびギャップ化B L A S Tプログラムを利用する際、それぞれのプログラム(例えばX B L A S TおよびN B L A S T)のデフォルトパラメーターを用いてもよい。

【0061】

本発明はまた、本発明の配列番号中に示される配列の「保存的配列修飾」、すなわち、該ヌクレオチド配列にコードされるかまたは該アミノ酸配列を含有する抗体の、抗原への結合を抑制しない、ヌクレオチドおよびアミノ酸配列修飾も含む。こうした保存的配列修飾には、ヌクレオチドおよびアミノ酸置換、付加および欠失が含まれる。例えば、当該技術分野に知られる標準的技術、例えば部位特異的突然変異誘発およびP C R 仲介性突然変異誘発によって、修飾を導入してもよい。保存的アミノ酸置換には、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されているものが含まれる。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが、当該技術分野において定義されてきている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を持つアミノ酸(例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を持つアミノ酸(例えばアスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖を持つアミノ酸(例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖を持つアミノ酸(例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、ベータ分枝側鎖を持つアミノ酸(例えばスレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族側鎖を持つアミノ酸(例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)が含まれる。したがって、ヒト抗A L K抗体中の予測される非必須アミノ酸残基は、好ましくは、同じ側鎖ファミリー由来の別のアミノ酸残基で置換される。抗原結合を排除しない、ヌクレオチドおよびアミノ酸の保存的置換を同定する方法が当該技術分野に周知である(例えば、B r u m m e l l r a , B i o c h e m . 32 : 1180 - 1187 (1993) ; K o b a y a s h i r a P r o t e i n E n g . 12 (10) : 879 - 884 (1999) ; およびB u r k s r a P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 94 : 412 - 417 (1997) を参照されたい)。

【0062】

あるいは、別の態様において、飽和突然変異誘発によるなどで、抗A L K抗体コード配列のすべてまたは一部に渡って、突然変異をランダムに導入し、そして生じた修飾抗A L K抗体を、結合活性に関してスクリーニングしてもよい。「コンセンサス配列」は、関連配列のファミリーにおいて、最も頻繁に存在するアミノ酸(またはヌクレオチド)から形成される配列である(例えば、W i n n a k e r , F r o m G e n e s t o C l

10

20

30

40

50

ones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987を参照されたい)。タンパク質ファミリーにおいて、コンセンサス配列中の各位は、該ファミリーにおいて、その位で最も頻繁に存在するアミノ酸によって占められる。2つのアミノ酸が等しく頻繁に存在する場合、コンセンサス配列中にどちらが含まれてもよい。

【0063】

本明細書に提供する表および図を参照することにより、ヒトALK-1タンパク質のエピトープ390～406に対して反応性である抗体の可変領域CDRのアミノ酸配列を最適に並列させることによって、抗体重鎖/軽鎖可変領域CDR(単数または複数)のコンセンサス配列を得てもよい。

10

【0064】

用語「ベクター」は、連結されている別の核酸を輸送可能な核酸分子を指す。1つの種類のベクターは、「プラスミド」であり、これは、さらなるDNAセグメントを連結可能な環状二本鎖DNAループを指す。別の種類のベクターは、さらなるDNAセグメントをウイルスゲノム内に連結可能な、ウイルスベクターである。特定のベクターは、導入された宿主細胞中で、自律複製することが可能である(例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクター、およびエピソーム哺乳動物ベクター)。宿主細胞内に導入した際に、宿主細胞ゲノム内に他のベクター(例えば非エピソーム哺乳動物ベクター)を組み込んでもよく、そしてそれによって、宿主ゲノムと一緒に該ベクターが複製される。

【0065】

20

用語「宿主細胞」は、発現ベクターが導入されている細胞を指す。宿主細胞には、細菌、微生物、植物または動物細胞が含まれてもよい。形質転換に感受性である細菌には、大腸菌またはサルモネラ属(*Salmonella*)の株などの腸内細菌科(*enterobacteriaceae*);枯草菌(*Bacillus subtilis*)などのバチルス科(*Bacillaceae*);肺炎球菌(*Pneumococcus*);連鎖球菌属(*Streptococcus*)のメンバー、およびインフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)が含まれてもよい。適切な微生物には、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)およびピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)が含まれる。適切な動物宿主細胞株には、CHO(チャイニーズハムスター卵巣株)およびNS0細胞が含まれる。

30

【0066】

用語「治療する」、「治療すること」および「治療」は、本明細書記載の療法的または予防的手段を指す。「治療」法は、障害または再発障害の1以上の症状を防止するか、治療させるか、遅延させるか、その重症度を減少させるか、または改善するための、あるいはこうした治療の非存在下で予期されるものを超えて、被験体の生存を延長するための、こうした治療が必要な被験体、例えばALKが仲介する障害を有する被験体またはこうした障害を最終的に獲得しうる被験体への、本発明の抗体の投与を使用する。

【0067】

用語「ALKが仲介する障害」は、ALKが仲介する癌または腫瘍と関連する疾患状態および/または症状を指す。一般的に、用語「ALKが仲介する障害」は、ALKの関与を要する、任意の障害、該障害の症状の開始、進行または持続を指す。ALKが仲介する典型的な障害には、限定されるわけではないが、例えば、癌、特に神経膠芽腫が含まれる。

40

【0068】

用語「有効用量」または「有効投薬量」は、望ましい効果を達成するかまたは少なくとも部分的に達成するのに十分な量を指す。用語「療法的有効用量」は、疾患をすでに患っている患者において、疾患およびその合併症を治療させるかまたは少なくとも部分的に抑止するのに十分な量と定義される。この使用に有効な量は、治療中の障害の重症度および患者自身の免疫系の全身状態に応じるであろう。

【0069】

50

用語「被験体」は、任意のヒトまたは非ヒト動物を指す。例えば、本発明の方法および組成物を用いて、癌、例えば神経膠芽腫の被験体を治療してもよい。

別に定義しない限り、本明細書で用いるすべての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野の一般の当業者に、一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本発明の実施または試験において、本明細書記載のものと類似であるかまたは同等である方法および材料を用いてもよいが、適切な方法および材料を以下に記載する。不一致の場合は、定義を含む本明細書が支配するであろう。さらに、材料、方法、および実施例は例示のみであり、そして限定することを意図しない。

【0070】

本発明の多様な側面を、以下のサブセクションにさらに詳細に記載する。多様な態様、優先度および範囲を任意に組み合わせてもよいことが理解される。さらに、特定の態様に応じて、選択される定義、態様または範囲は当てはまらない可能性もある。

【0071】

本発明は、第一の側面において、ヒトA L Kタンパク質に結合する抗体であって、配列番号2の配列に少なくとも50%の配列同一性を持つ配列の可変重鎖C D R 3を含む、前記抗体を提供する。好ましくは、配列同一性は、少なくとも60%、70%、75%、80%、またはより好ましくは少なくとも90%である。最も好ましくは、C D R 3は、配列番号2の正確な配列を有する。

【0072】

本発明の好ましい態様において、抗体は、ヒトA L Kタンパク質に特異的に結合し、すなわち、ヒトA L Kタンパク質のP T N結合性部位（配列番号1）に比較して、P T N結合性部位が2アミノ酸残基しか異ならないマウスA L Kタンパク質には、結合しない。3位のヒト・イソロイシンは、対応するマウス配列において、バリンであり、そしてアスパラギン酸はアラニンである。

【0073】

本発明の抗体は、全長抗体であってもよいが、また抗体断片であってもよく、例えばs c F vまたはF a b断片であってもよい。抗原結合性断片は、当該技術分野に周知である。好ましくは、s c F v抗体を用いる。

【0074】

重鎖および軽鎖は、各々、抗原結合に主に関与する3つのC D R、C D R 1、C D R 2およびC D R 3を含む、フレームワーク配列で構成される。本発明の抗体は、H 3型のV Hドメインおよびラムダ1型のV Lドメインを含む。

【0075】

本発明の抗体のV HおよびV Lフレームワークは、細胞内還元性環境において機能可能であるように、安定であり、そして可溶性である。好ましくは、フレームワークは、「品質管理系」と称される酵母スクリーニング系によって以前単離されたフレームワーク4.4である（Auf der Maurら 2001； Auf der Maurら 2004）。フレームワーク部分が、下線がなくそしてまっすぐな文字によって示され、一方、C D R配列が下線で示され、そしてリンカー配列が斜字体である、例えば配列番号20（以下を参照されたい）から、フレームワークの配列を推定してもよい。

【0076】

本発明の抗体は、配列番号1の配列に、少なくとも75%、好ましくは80%、85%、90%、95%、または最も好ましくは100%同一である配列の16アミノ酸A L Kエピトープペプチドに結合可能である。この配列はまた、P T N結合性部位と称され、そして全ヒトゲノムにおいてユニークな配列である。対応するマウス配列は、16アミノ酸のうち2つが異なり、すなわち、それぞれ、IまたはDの代わりに、3位がV、そして7位がAである。好ましくは、本発明の抗体は、マウスA L KでなくヒトA L Kに結合し、すなわち、ヒトタンパク質に特異的である。ほぼ残基391～406を含むかまたはこれらの残基からなるA L Kエピトープは、A L Kに特異的に結合し、そしてA L Kが仲介する活性を遮断しうるかまたは阻害しうる抗体または抗原結合性断片を選択するのにユニー

10

20

30

40

50

クに適している。このエピトープはまた、A L K活性を特異的に遮断する抗体をスクリーニングするかまたは作製するのにも適している。したがって、このエピトープ、特にほぼ残基391～406を含むかまたはほぼこれらの残基からなるエピトープは、本明細書にさらに記載するような能動免疫療法剤またはワクチンとして使用するのにユニークに適している。

【0077】

本発明の抗体は、30 nM以下、好ましくは10 nM以下、最も好ましくは3 nM未満の K_d でA L Kエピトープペプチドに対するアフィニティーを有する。

本発明の別の態様において、配列番号3の配列に、少なくとも50%の配列同一性を持つ配列の可変軽鎖CDR3を含む抗体。好ましくは、配列同一性は、少なくとも60%、70%、80%、85%、より好ましくは少なくとも90%である。最も好ましくは、CDR3は配列番号3と同一である。再び、この抗体は、配列番号1の配列に、少なくとも75%、好ましくは80%、85%、90%、95%、または最も好ましくは100%のアミノ酸同一性を持つ配列の16アミノ酸A L Kエピトープペプチドに結合する。また、抗体は、10 nM未満、好ましくは7 nM未満の K_d の、A L Kエピトープペプチドに対するアフィニティーを有する。

10

【0078】

本発明の好ましい態様において、抗体は、配列番号4のVH配列および配列番号5のVL配列を含む。さらに、該抗体は、CDRの少なくとも1つにおいて、少なくとも1つの突然変異を含み、約3 nM未満の K_d によって特徴付けられる、より高いアフィニティーを生じてよい。前記の少なくとも1つの突然変異は、好ましくは、VHおよび/またはVLのCDR1またはCDR2中にあり、最も好ましくはVHのCDR2中にある。

20

【0079】

本発明の別の好ましい態様において、抗体は、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、または配列番号13の群より選択される配列を含む、可変重鎖CDR2を含む。好ましくは、全CDR2が定義されるように、これらの定義されるCDR2配列には、アミノ酸残基AIが先行し、そして配列番号17の配列が続く。

【0080】

本発明の好ましい抗体は、配列番号4のVH配列および配列番号5のVL配列を含む。s c F v抗体において、ドメイン構造は、 NH_2 - VL - リンカー - VH - COOHまたは NH_2 - VH - VL - リンカー - VL - COOHであってもよく；好ましくは、リンカーは配列番号16の配列を有する。あるいは、配列番号4および5に示す可変領域を操作して全長抗体、例えばIgGまたはIgM内に入れてもよい。本発明の可変領域と組み合わせるのに適した定常領域が当該技術分野に知られる。

30

【0081】

本発明の範囲内には、薬剤としてのまたは診断ツールとしての抗体または抗体誘導体の使用がある。好ましくは、癌または腫瘍の治療用の薬剤の産生が想定される。この目的のため、放射性核種または放射金属標識を用いて、抗体を放射標識してもよい。これは腫瘍ターゲティング、画像法および生体分布研究に特に価値がある。また、組換えDNA技術によって、可変V遺伝子のコード領域を修飾毒素ドメインに遺伝的に融合させることが可能である。例えば、s c F vが腫瘍マーカータンパク質に特異的であるs c F v毒素融合体は、毒素を腫瘍にターゲティングすることも可能であり、腫瘍部位で毒素が細胞毒性を引き起こす。こうしたターゲティング化療剤は、腫瘍において、細胞毒性剤または放射性核種の選択的濃縮を生じ、そして正常組織に対する毒性を和らげるはずである。

40

【0082】

本発明の好ましい態様において、癌または腫瘍、好ましくは神経芽細胞腫、神経膠芽腫、横紋筋肉腫、乳癌、黒色腫、膵臓癌、B細胞非ホジキンリンパ腫、甲状腺癌、小細胞肺癌、網膜芽細胞腫、ユーイング肉腫、前立腺癌、結腸癌、または膵臓癌、好ましくは神経膠芽腫、神経芽細胞腫および横紋筋肉腫の治療に、抗体を用いる。A L K発現およびタン

50

パク質は、多くの軟組織腫瘍で検出されてきている（Liら、2004）。全長ALKは、これらのヒト腫瘍で見いだされている。さらに、抗体は、好ましくは、局所治療に用いられる。最も好ましいのは、神経膠芽腫の局所治療である。

【0083】

本発明の別の側面は、本発明の抗体をコードするDNA配列を提供することである。ESBA512（配列番号19）に適した原核発現ベクターは、pTFT74である（ESBA512コード配列を含む配列に関しては、配列番号90を参照されたい）。ここで、ESBA512コード配列は、T7プロモーターの調節下にあり、そして組換え遺伝子産物は、通常、封入体上で精製される。別の好ましい原核発現ベクターはpAK400であり、この中で、ESBA512配列は、精製を単純にするため、hisタグ化される（ESBA512コード配列を含む配列に関しては、配列番号89を参照されたい）。遺伝子産物は、宿主細胞によって、周辺質内に分泌される。

10

【0084】

さらに、前記DNA配列を含む発現ベクター、および前記発現ベクターで形質転換された適切な宿主細胞を提供する。好ましくは、前記宿主細胞は、大腸菌細胞である。

本発明のさらに別の側面は、前記抗体の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を、前記抗体の合成を可能にする条件下で培養し、そして前記培養から前記抗体を回収する工程を含む、本発明の抗体の産生である。

【0085】

本発明の別の側面は、配列番号1の残基391～406を含むかまたは該残基から本質的になる、ALKエピトープを提供することである。前記エピトープは、抗ALK抗体またはその断片を同定するか、スクリーニングするか、または作製するのに適している。好ましくは、単離ALKタンパク質またはその断片の残基391～406（配列番号1）に特異的に結合可能な抗体またはその抗原結合性断片。より好ましくは、抗体は、一本鎖抗体（scFv）、Fab断片、IgGまたはIgMである。

20

【0086】

さらなる側面において、単離ALKタンパク質またはその断片、あるいはALKのエピトープをコードする核酸を含む、ALKワクチンを提供する。好ましくは、ワクチンは、単離ALKタンパク質の残基391～406を含む。前記ワクチンは、好ましくは、キャリアー、アジュバント、および/または免疫応答を増進するハプテンとともに配合される。

30

【0087】

本発明の配列は、以下のものである：

【0088】

【化 1 - 1】

配列番号 1: GRIGRPDNPFRVALEY

ヒト ALK エピトープペプチド(ALK タンパク質のアミノ酸
391-406); 下線を引いた残基はマウス相同体では異なる。

配列番号 2: RDAWLDVLSDGFDY

VH の ESBA521 CDR 3。ランダム化後に得た残基を下線で
示す。

10

配列番号 3: ATWDNDKWGVV

VL の ESBA521 CDR 3。ランダム化後に得た残基を下線で
示す。

20

配列番号 4:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAWLDVLSDGFDYWGQ
GTLVTVSS

ESBA521 の VH。CDR を下線で示す。

配列番号 5:

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSTSNIGDNYVSWYQQLPGTAPQLLIYDNTKRPS
GIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCATWDNDKWGVVFGGGTKLEVLG

ESBA521 の VL。CDR を下線で示す。

30

配列番号 6:

AISGSGGSTYYADSVKG

ESBA521 の VH CDR 2

40

配列番号 7:

AINMKGNDRIYADSVKG

scFv 265.1 の VH CDR 2

【 0 0 8 9 】

【化 1 - 2】

配列番号 8:

AIRTNSKEYYADSVKG**scFv 43.2 の VH CDR 2**

配列番号 9

AIKTDGNHKYYADSVKG

10

scFv 100.2 の VH CDR 2

配列番号 10:

RTDSKEQYYADSVKG**scFv 2.11 の VH CDR 2**

配列番号 11:

20

ETSSGSTYYADSVKG**scFv 28.11 の VH CDR 2**

配列番号 12:

NTGGGSTYYADSVKG**scFv 33.11 の VH CDR 2**

30

配列番号 13:

NTRGQNEYADSVKG**scFv 4.12 の VH CDR 2**

配列番号 16

GGGSGGGSGGGSSGGGS

40

VL および VH を連結するリンカー

【 0 0 9 0 】

【化 1 - 3】

配列番号 17

YYADSVKG

ESBA521 およびその誘導体の CDR2 の C 末端半分。

配列番号 18

DAGIAVAGTGFDY

FW4.4 の VH CDR3

10

配列番号 19

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSTSNIGDNYVSWYQQLPGTAPQLLIYDNTKRPS
GIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCATWDNDKWGVVF~~GGG~~TKLEVLGGGG
GSGGGGSGGGGSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA
PGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RDWLDVLSDGFDYWGQGTLVTVSS

20

scFv ESBA521、CDR を下線で示し、リンカーを斜字体で示す。

配列番号 20

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSTSNIGDNYVSWYQQLPGTAPQLLIYDNTKRPS
GIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSGVVF~~GGG~~TKLTVLGGGG
GSGGGGSGGGGSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA
PGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RDAGIAVAGTGFDYWGQGTLVTVSS

30

FW4.4、CDR を下線で示し、リンカーを斜字体で示す。

【 0 0 9 1 】

【化 1 - 4】

配列番号 21

cagtctgtgctgacgcagccgccctcagtgtctgcggccccagga
cagaagggtcaccatctcctgctccggaagcacctccaacattggcgataattatgta
tcctgggtaccaacaactcccaggaacagcccccaactcctcatttatgacaatact
aaacgaccctcagggattcctgaccggttctctgggtccaagtctggcacgtcagcc
accctgggcatcacccgactccagactggggacgaggccgattattactgcgcgacc
tgggataatgataagtgggggtgtgggttttcggcggagggaccaagctcgaggtccta
ggt

10

ESBA521 VL の核酸配列

CDR を下線で示す

配列番号 22

gaggtgcagctgggtggagtccgggggaggcttggtacagcctggg
gggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcacctttagcagctatgccatg
agctgggtccgccagggtccaggggaaggggctggagtgggtctcagctattagtgg
agtgggtggtagcacatactacgcagactccgtgaagggccggttcaccatctccaga
gacaattccaagaacacgctgtatctgcaaataaacagcctgagagccgaggacacg
gccgtatattactgcgcgcgtgatgcgtgggttggtatgtgctttcggatggctttgac
tactggggccaggggaaccctgggtcacccgtctcctcg

20

ESBA521 VH の核酸配列

CDR を下線で示す

30

【 0 0 9 2 】

【化 1 - 5】

配列番号 23

cagtctgtgctgacgcagccgccctcagtgtctgcggccccagga
 cagaaggtcaccatctcctgctccggaagcacctccaacattggcgataattatgta
 tcctgggtaccaacaactcccaggaacagcccccaactcctcatttatgacaatact
 aaacgaccctcagggattcctgaccgggttctctgggtccaagtctggcacgtcagcc
 accctgggcatcacccgactccagactggggacgagggccgattattactgcgcgacc
 tgggataatgataagtgggggtgtggttttcggcggagggaccaagctcgaggtccta
 ggtggtggtggtggttctggtggtggtggttctggcggcgggcggctccagtgggtggt
 ggatccgaggtgcagctggtggagtccgggggagggcttggtacagcctgggggggtcc
 ctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttttagcagctatgccatgagctgg
 gtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcagctattagtggtagtggt
 ggtagcacatactacgcagactccgtgaagggccggttcaccatctccagagacaat
 tccaagaacacgctgtatctgcaaataaacagcctgagagccgaggacacggccgta
 tattactgcgcgcgtgatgcgtggttggatgtgctttcggatggctttgactactgg
 ggccaggggaaccctgggtcacctgtctcctcg

10

20

ESBA521 の核酸配列

CDR を下線で示し、リンカーを斜字体で示す

【実施例】

【0093】

ここで、実施例によって本発明をさらに記載する：

材料および方法

一般的に、本発明の実施は、別に示さない限り、化学、分子生物学、組換えDNA技術、免疫学（特に、例えば抗体技術）の慣用的な技術、およびポリペプチド調製における標準的技術を使用する。例えば、Sambrook, FritschおよびManiatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty監修, Irl Pr (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlowら, C.S.H.L. Press, Pub. (1999); およびCurrent Protocols in Molecular Biology, Ausubelら監修, John Wiley & Sons (1992)を参照されたい。

30

40

【0094】

実験1： A1k結合性scFvを同定するためのスクリーニング

抗体 - 抗原相互作用に関する豊富な構造的な研究において、重鎖の相補性決定領域3 (CDR - H3) 中の残基は、一般的に抗原への大部分の実質的な接触に寄与することが見いだされた (ChothiaおよびLesk, 1987; Chothiaら, 1985; Padlan, 1994)。本発明者らは、本発明者らが最近記載した酵母2ハイブリッド抗原 - 抗体相互作用スクリーニング技術を適用して、ランダム化した合成CDR - H3配列の4つのscFvライブラリーをスクリーニングすることによって、抗原結合性s

50

c F v を直接単離した (A u f d e r M a u r ら、2002)。4つのライブラリーは、4つの異なる安定ヒト s c F v フレームワークに基づき、この中で、可変重鎖の第三の C D R ループ (V H - C D R 3) 内の7つのアミノ酸がランダム化された。標準的 P C R クローニング技術によって、ランダム化部分を導入した。「品質管理」と称される酵母スクリーニング系によって、ヒト・チロシン受容体キナーゼ未分化リンパ腫キナーゼ (A L K) の細胞外ドメイン由来の16アミノ酸ペプチドに対して、s c F v ライブラリーをスクリーニングした (A u f d e r M a u r ら、2001; A u f d e r M a u r ら、2004)。簡潔には、品質管理技術は、ヒト可変軽鎖 (V L) および可変重鎖 (V H) の天然プールから、安定性、可溶性および発現収率などの好ましい生物物理学的特性を持つ V L および V H の組み合わせを同定するための、抗原独立性イントラボディ選択系である。第一のスクリーニング周期後、4つの s c F v ライブラリーの1つから、1つの有望でそして特異的な結合剤を単離した。この特定の s c F v を、フレームワーク F W 4 . 4 ライブラリーから得た。F W 4 . 4 (配列番号20) は、古典的で柔軟なグリシン - セリンリンカー (G G G G S)₄ によって、V H₃ ドメインに連結された、V L ドメイン (ラムダ1) からなる。F W 4 . 4 の V H C D R 3 は、13アミノ酸を含む (D A G I A V A G T G F D Y ; 配列番号18)。ライブラリーを構築するため、縮重オリゴヌクレオチドを用いた標準的 P C R クローニング法によって、V H C D R 3 の中央部分をランダム化した (D A X X X X X X X G F D Y)。最後の2残基 (A s p および T y r) の構造的重要性が多くの場合で立証されているため、これらを不変のまま維持した (C h o t h i a および L e s k、1987)。ライブラリーの複雑性を取り扱い可能な次元に留めるため、残りの残基は修飾しなかった。G a l 4 の転写活性化ドメインへの C 末端融合体として、酵母発現ベクター (p L i b 1) 中に、s c F v ライブラリーをクローニングした (A u f d e r M a u r ら、2002)。

【0095】

相互作用スクリーニングのための抗原として、ヒト A l k のリガンド結合性ドメイン (L B D) を選択した (S t o i c a ら、2001)。DNA 結合性タンパク質 L e x A への C 末端融合体として、別の酵母発現ベクター (p B a i t 1) 内に、この16アミノ酸ペプチドをクローニングした。

【0096】

6つの L e x A 結合性部位の調節下で安定に組み込まれたレポーター遺伝子 H I S 3 および l a c Z を含有するレポーター酵母株 Y D E 1 7 3 (A u f d e r M a u r ら、2002) を、G a l 4 活性化ドメインに融合したランダム C D R - H 3 s c F v ライブラリーと一緒に、L e x A に融合した A l k L B D を発現するベイト (b a i t) ・ベクターで形質転換した。ヒスチジンを欠き、そして H I S 3 遺伝子産物の競合的阻害剤である 2 . 5 m M 3 - アミノ - トリアゾール (3 - A T) を含有するプレート上で、形質転換された細胞を選択した。増殖するコロニーを6日間に渡って摘み取り、そしてライブラリープラスミドを単離した。レスキューされたプラスミドで同じレポーター株を形質転換して、遺伝子活性化が抗原依存性であることを確認した。定量的液体 - ガラクトシダーゼアッセイを実行して、A l k L B D、すなわち16アミノ酸 A L K ペプチド、および選択された s c F v の間の結合強度を測定した。レポーター遺伝子活性化が最高である s c F v はまた、E L I S A において、A l k L B D ペプチドに、最適なアフィニティー (~ 3 1 n M) を示した (データ未提示)。

【0097】

A L K 結合に寄与すると同定された他の V H C D R 3 配列の配列を、以下の表 1 a に提供する。

【0098】

10

20

30

40

【表 1】

クローン	VH CDR 3 (突然変異した残基)
WT FW4.4	DAGIAVAGTGFDY (配列番号 24)
H5 SH 2.1	DAKFMSDGIGFDY (配列番号 25)
H5 SH 4.1	DAWGWTILSGFDY (配列番号 26)
H5 SH 5.1	DAAVMIRYEGFDY (配列番号 27)
H5 SH 2.3	DAWIYWAREGFDY (配列番号 28)
H5 SH 3.3	DACMTYSREGFDY (配列番号 29)
H5 SH 5.3	DAWLDVLSGFDY (配列番号 30)
H5 SH 14.3	DAPSVNDREGFDY (配列番号 31)

10

【 0 0 9 9 】

他の適切なフレームワークの配列を以下の表 1 b に提供する。

【 0 1 0 0 】

【表 2】

FW	配列
5.2	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTLTHYLAWYQQKPGQAPRLLIYD TSKRATGTPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDSALYYCQQRNSWPHTFGG GTKLEIKRGGGGGSGGGGSGGGGSSGGGSEVQLVESGGGVAQPGGSLRVS CAASGFSFSSYAMQWVRQAPGKGLEWVAVISNDGRIEHYADAVRGRFTIS RDNSQNTVFLQMNSLRSDDTALYYCAREIGATGYLDNWGQGTLTVSS (配列番号 15)

20

【 0 1 0 1 】

実験 2 : アフィニティー成熟

より高いアフィニティーを持つ s c F v を得るため、突然変異誘発および酵母における第二のスクリーニング周期による、さらなるアフィニティー成熟プロセスに、この一次結合剤を供した。アフィニティー成熟を可能にする際、A l k L B D ペプチドと一次結合剤の相互作用によって駆動されるレポーター遺伝子活性化を弱めるため、L e x A A l k L B D ペプチド融合タンパク質の発現レベルを減少させた。p B a i t 1 ベクター上の強いアクチンプロモーターを、A D H プロモーター（アルコールデヒドロゲナーゼ）の一部切除され、そしてしたがってより活性でない型と交換して、p B a i t 3 を生じた。一次結合剤の存在下でのベイト発現レベルのこの減少は、ヒスチジンを欠き、そして 5 m M 3 - A T を含有するプレート上での増殖を阻害するのに十分であった。可変軽鎖内の C D R 3 の部分をランダム化することによって、アフィニティー成熟のための、一次結合剤の突然変異誘発を達成した。相同組換えによって、酵母中でこれを直接行った (S c h a e r e r - B r o d b e c k および B a r b e r i s , 2 0 0 4) 。 F W 4 . 4 の V L C D R 3 は、11 アミノ酸 (配列番号 14 : G T W D S S L S G V V) を含む。最初の 2 つの位は、第一の位が G l y 、 A l a または G l n のいずれかをコードし、そして第二の位が T h r 、 S e r または A l a をコードするように、部分的にランダム化された。V L C D R 3 内の 5 ~ 8 位では、すべてのアミノ酸残基を可能にした。残りの位は不変のままにした。P C R によってランダム化を導入した。生じた P C R 産物は、356 b p のサイズを有し、そして 267 b p の上流および 27 b p の下流フレームワーク配列を持つランダム化 C D R カセットを含んだ。この産物は、いわゆるドナー P C R 断片であり、該断片は、ターゲットベクターに対する相同性を所持する。ターゲットベクターは、G a l 4 の活性化ドメインに融合した一次結合剤をコードする酵母プラスミド (p L i b 1)

30

40

50

である。相同組換えの効率を改善し、そして続くスクリーニングにおいて偽陽性を排除するため、ターゲットベクター中のCDR-L3をわずかに修飾した。ユニークなSacI制限部位をVL CDR3の中央に導入し、これによって融合タンパク質のscFvコード部分にフレームシフトが起こり、そしてAlk LBDに結合不能な一部切除タンパク質が生じる。さらに、SacI部位は、ターゲットベクターの直線化を可能にし、これによって、酵母における組換え効率が増進する。

【0102】

一部切除ADHプロモーターからLexA Alk LBDを発現するプラスミド(pBait3)でレポーター酵母株YDE173をプレ形質転換(pre-transformation)することによって、スクリーニングを開始した。このプレ形質転換酵母細胞を再びコンピテントにして、そして直線化したターゲットベクターで、そしてVL CDR3の上流および下流に相同性を所持するドナーPCR断片で同時形質転換した。PCR産物およびターゲットベクター間の相同組換えに際して、新規VL CDR3配列をターゲットベクターの対応する部位内に組み込む。この事象の最終結果として、始原VL CDR3は、ランダム化VL CDR3に交換された。これによって、レポーター遺伝子発現を活性化し、そしてAlk LBDペプチドとの相互作用に際して選択プレート上での増殖を可能にするであろう、新規VL CDR3配列を持つ、完全に機能する融合タンパク質を発現する、環状プラスミドの再構築が可能になる。

【0103】

6日間の観察期間に渡って、選択プレート上で総数119のクローンが増殖した。これらのクローンを摘み取り、そしてライブラリープラスミドを単離し、そして同じレポーター酵母株内に再形質転換した。定量的液体-ガラクトシダーゼアッセイを実行して、Alk LBD(抗原)およびアフィニティー成熟scFv間の結合強度を測定した。lacZの最高の活性化を持つ20のクローンを、Alk LBDペプチドを用いたELISAにおいてもまた試験した。最適候補は、約7nMのK_Dを明らかにし(図3)、そしてESBA521と名付けられた。

【0104】

ALK結合に寄与すると同定された他のVL CDR3配列の配列を以下の表1cに提供する。

【0105】

10

20

30

【表 3】

クローン	VL CDR 3
WT FW4.4	GTWDSSLSGVV (配列番号 32)
5.3-9.1	AAWDSVKHGVV (配列番号 33)
5.3-21.1	AAWDNSMRGVV (配列番号 34)
5.3-22.1	AAWDTMRYGVV (配列番号 35)
5.3-25.1	AAWDTTRVGVV (配列番号 36)
5.3-27.1	ASWDTMLKGVV (配列番号 37)
5.3-28.1	ASWDTPTCGVV (配列番号 38)
5.3-29.1	ATWDISRCGVV (配列番号 39)
5.3-46.1	ATWDTVCAGVV (配列番号 40)
5.3-53.1	ATWDVDVFGVV (配列番号 41)
5.3-57.1	ATWDDVVGGVV (配列番号 42)
5.3-86.1	AAWDSFYNGVV (配列番号 43)
5.3-94.1	ASWDTLIEGVV (配列番号 44)
5.3-107.1	ATWDNDKWGVV (配列番号 45)
5.3-112.1	AAWDSTTCGVV (配列番号 46)
5.3-113.1	ATWDMWMKGVV (配列番号 47)
5.3-117.1	GTWDSSLSGVV (配列番号 48)
5.3-118.1	AAWDWVLGGVV (配列番号 49)
14.3-6.1	ATWDNPGQGVV (配列番号 50)
14.3-7.1	ATWDDWVIGVV (配列番号 51)
14.3-8.1	ASWDDQKWGVV (配列番号 52)
14.3-9.1	ATWDTNRHGVV (配列番号 53)
14.3-12.1	ASWDDLHIGVV (配列番号 54)
14.3-13.1	ASWDEEAWGVV (配列番号 55)
14.3-21.1	ATWDYIKIGVV (配列番号 56)
14.3-48.1	ATWDTFERGVV (配列番号 57)
14.3-49.1	ATWDSNLIGVV (配列番号 58)
5.3-24.,1	ATWDNNTCGVV (配列番号 59)
5.3-3.1	AAWDCDINGVV (配列番号 60)
5.3-8.1	ASWDSMKIGVV (配列番号 61)
5.3-19.1	ATWDCTRAGVV (配列番号 62)

【0106】

実験3: s c F v E S B A 5 2 1は、ヒトA L Kの膜貫通型に特異的に結合する。新たに同定されたs c F vが、生存細胞表面上の膜貫通ヒトA L Kタンパク質もまた認識可能であるかどうかを試験するため、一過性にトランスフェクションされたH E L A細胞の免疫染色実験を実行した。E S B A 5 2 1は、ポリクローナル抗体に匹敵する方式で、A L Kタンパク質と反応する(図4)。対照実験において、フレームワーク4.4 s c F vは、ヒトA L Kと反応しないことが示された。マウス抗原性ペプチドは、ヒトペプチド配列と2つのアミノ酸位が異なるにすぎないが、驚くべきことに、E S B A 5 2 1は、ヒトA l kタンパク質にしか結合せず、対応するマウスタンパク質には結合しない。対照的に、ポリクローナルA L K抗体は、ヒトおよびマウスタンパク質の両方を認識する。したがって、E S B A 5 2 1の結合は、細胞表面でのヒトA L Kタンパク質に特異的であ

る。

【 0 1 0 7 】

実験 4 : V H C D R 2 の P C R 突然変異誘発による改善された結合剤の単離

抗原結合をさらに改善するため、この場合は、V H の C D R 2 を P C R 突然変異誘発によって変化させ、そして酵母レシピエント内に形質転換し、該レシピエント中で、類似の方式で C D R 2 での相同組換えが強制されることを除いて、第一周期のアフィニティー成熟と同じ 2 ハイブリッドアプローチを用いて、さらなる周期のアフィニティー成熟において、E S B A 5 2 1 を出発 s c F v として用いた。再び、制限部位を C D R 2 中に導入して、ターゲットプラスミドの直線化を可能にした。C D R 2 中に導入した突然変異を表 2 に示す。

10

【 0 1 0 8 】

【表 4】

scFv (最適性能)	VH CDR 2 (突然変異した残基)
WT (ESBA521)	AISGSGGSTYYADSVKG (配列番号 63)
1.1	AI-KTDGQNYADSVKG (配列番号 64)
17.1	AIRSDGNERYYADSVKG (配列番号 65)
35.1	AINTNGNEKYYADSVKG (配列番号 66)
64.1	AISTNGKERYADSVKG (配列番号 67)
130.1	AIRTQSQEEYYADSVKG (配列番号 68)
152.1	AIKRSRSEQYYADSVKG (配列番号 69)
167.1	AIKSHSQQYYADSVKG (配列番号 70)
214.1	AINSEGOQRYADSVKG (配列番号 71)
225.1	AIKSKGQNKYYADSVKG (配列番号 72)
262.1	AIRTNSEKYYADSVKG (配列番号 73)
265.1	AINMKGNDYYADSVKG (配列番号 74)
43.2	AI-RTNSKEYADSVKG (配列番号 75)
70.2	AIKTESQORYADSVKG (配列番号 76)
99.2	AINSNKGQDYADSVKG (配列番号 77)
100.2	AIKTDGNHKYYADSVKG (配列番号 78)
109.2	AIDTKGNGQYYADSVKG (配列番号 79)
146.2	AIRSDSSHKYYADSVKG (配列番号 80)
173.2	AINTKSNEQYYADSVKG (配列番号 81)
199.2	AIRTDKNSYYADSVKG (配列番号 82)
2.11	AIRTDKSQYYADSVKG (配列番号 83)
19.11	AIRTNSKEEYYADSVKG (配列番号 84)
28.11	AIETSSGSTYYADSVKG (配列番号 85)
33.11	AINTGSGSTYYADSVKG (配列番号 86)
4.12	AINTRGQNEYADSVKG (配列番号 87)
6.12	AISTSG-STYYADSVKG (配列番号 88)

20

30

40

【 0 1 0 9 】

この方法後に得た単離 s c F v の中で、7 つが、2 ~ 3 n M の範囲の K_d を持つ、有意に改善されたアフィニティーを有することがわかり (図 5)、このうち最高のものは 2 8 . 1 1 であった。

【 0 1 1 0 】

実験 5 : 抗 A L K 抗体の投与に際する、腫瘍増殖の防止

50

ブレイオトロフィンに結合することが知られるアミノ酸(396~406)(Stoica 2001)を含む、ALKのアミノ酸391~406に結合する、抗体ESBA521の前駆体を選択した。前駆体のCDR中のさらなるアミノ酸をランダム化することによって、そしてALK細胞外ドメイン(ECD)の天然背景中に含有される391~406アミノ酸ストレッチに結合する結合剤に関して選択することによって、ESBA521を得た。これらの手順によって、PTNに結合するのと同じ部位で、高いアフィニティーでALK ECDに結合する抗体が生じた。本発明者らの知る限りでは、これは、ALKのPTN結合性部位を特異的にターゲティングする最初のモノクローナル抗体である。したがって、ESBA521は、ALK ECDに高いアフィニティーを有すると予測され、そしてALK受容体に対する結合に関して、ブレイオトロフィン(PTN)およびミッドカイン(MK)と効率的に競合し、そしてしたがって、ESBA521抗体は、ALKタンパク質へのMKおよびPTNリガンド結合両方を阻害するのに適している。

10

【0111】

ALKおよびそのリガンドは、新生物、腫瘍浸潤および血管新生に関与するため、ALKおよびその同族(cognate)リガンド間の相互作用を阻害すると、ALKが仲介する腫瘍形成が破壊される。

【0112】

特定の腫瘍に対するESBA521の効果は、以下に記載する以下の2つのアッセイによって測定可能である。

第一のアッセイにおいて、ALKが癌増殖を律速する役割を決定するため、異種移植片実験を準備する(Powers 2002)。簡潔には、10%ウシ胎児血清を補った2000万細胞/ml培地のU87MG細胞懸濁物を調製する。これらをNU/NUマウス内に注射して、そして生じた腫瘍を測定する。試験抗体、好ましくは全長抗体、より好ましくはpeg化抗体を導入し、そして腫瘍増殖を評価する。

20

【0113】

本発明の現在好ましい態様を示しそして記載しているが、本発明は、これに限定されず、請求項の範囲内で、別の方式で多様に具現され、そして実施されてもよいことが、はっきりと理解されるものとする。

【0114】

〔参考文献〕

30

【0115】

【化 2 - 1】

Auf der Maur, A., Escher, D., and Barberis, A. (2001). Antigen-independent selection of stable intracellular single-chain antibodies. *FEBS Lett* 508, 407-412.

Auf der Maur, A., Tissot, K., and Barberis, A. (2004). Antigen-independent selection of intracellular stable antibody frameworks. *Methods* 34, 215-224.

10

Auf der Maur, A., et al., Direct in vivo screening of intrabody libraries constructed on a highly stable single-chain framework. *J Biol Chem*, 277(47): p. 45075-85, 2002.

Bai RY. et al. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signalling pathway. *Blood* 96(13), 4319-4327, 2000.

20

Bowden et. et al. Anti-apoptotic signaling of pleiotrophin through its receptor, anaplastic lymphoma kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 277(39), 35862-35868, 2002.

30

Chothia, C., and Lesk, A. M. (1987). Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 196, 901-917.

Chothia, C., Novotny, J., Brucoleri, R., and Karplus, M. (1985). Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. *J. Mol. Biol.* 186, 651-663.

40

【 0 1 1 6】

【化 2 - 2】

Choudhuri et al., An Angiogenic Role for the Neurokines Midkine and Pleiotrophin in Tumorigenesis. Cancer Res. 57, 1814-1819, 1997.

Czubayko et al., Melanoma angiogenesis and metastasis modulated by ribozyme targeting of the secreted growth factor pleiotrophin. PNAS 93, 14753-14758, 1996.

10

De Juan C. et al. Genomic organization of a novel glycosylphosphatidylinositol MAM gene expressed in human tissues and tumors. Oncogene 21, 3089-3094, 2002.

Delsol G. et al. A new subtype of large B-cell lymphoma expressing the ALK kinase and lacking the 2;5 translocation. Blood 89(5), 1483-1490, 1997.

20

Dirks WG. et al. Expression and functional analysis of the anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene in tumor cell lines. International Journal of cancer 100, 49-56, 2002.

30

Duyster J. et al. Translocations involving anaplastic lymphoma kinase (ALK). Oncogene 20, 5623-5637, 2001.

Ergin M. et al. Inhibition of tyrosine kinase activity induces caspase-dependent apoptosis in anaplastic large cell lymphoma with NPM-ALK (p80) fusion protein. Experimental Hematology 29, 1082-1090, 2001.

40

【 0 1 1 7】

【化 2 - 3】

Fang et al., Pleiotrophin stimulates fibroblasts and endothelial and epithelial cells and is expressed in human cancer. JBC vol. 267 p. 25889, 1992.

Fiorani C. et al. Primary systemic anaplastic large-cell lymphoma (CD30+): advances in biology and current therapeutic approaches. Clinical Lymphoma 2(1), 29-37, 2001.

10

Iwahara T. et al. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. Oncogene 14, 439-449, 1997.

Kutok JL. and Aster JC. Molecular biology of anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large-cell lymphoma. Journal of Clinical Oncology 20(17), 3691-3702, 2002.

20

Ladanyi M. Aberrant ALK tyrosine kinase signalling. Different cellular lineages, common oncogenic mechanisms? American Journal of Pathology 157(2), 341-345, 2000.

30

Lamant et al. Expression of the ALK tyrosine kinase gene in neuroblastoma. Am. J. Pathol. 156, 1711-1721, 2000.

【 0 1 1 8】

【化 2 - 4】

Li, X.-Q., Hisaoka, M., Shi, D.-R., Zhu, X-Z., and Hashimoto, H. Expression of Anaplastic Lymphoma Kinase in soft tissue tumors: an immunohistochemical and molecular study of 249 cases. Human pathology 35, 711-721, 2004.

Loren CE. et al. Identification and characterization of Dalk: a novel Drosophila melanogaster RTK which drives ERK activation in vivo. Genes to cells 6(6), 531-544, 2001.

10

Miyake I. et al. Activation of anaplastic lymphoma kinase is responsible for hyperphosphorylation of ShcC in neuroblastoma cell lines. Oncogene 21, 5823-5834, 2002.

20

Morris SW. et al. ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). Oncogene 14, 2175-2188, 1997.

Morris SW. et al. ALK+CD30+ lymphomas: A distinct molecular genetic subtype of non-Hodgkin's lymphoma. British Journal of Haematology 113, 275-295, 2001.

30

O'Brien et al., The angiogenic factor midkine is expressed in bladder cancer and overexpression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancer. Cancer Res. 56, 2515-2518, 1996.

【 0 1 1 9】

40

【化 2 - 5】

Padlan, E. A. (1994). Anatomy of the antibody molecule. Mol Immunol 31, 169-217.

Powers C. et al. Pleiotrophin signalling through anaplastic lymphoma kinase is rate-limiting for glioblastoma growth. The Journal of biological chemistry 277(16), 14153-14158, 2002.

10

Pulford K. et al. Anaplastic lymphoma kinase proteins and malignancy. Current Opinion in Hematology 81, 231-236, 2001.

Pulford K. et al. Anaplastic lymphoma kinase proteins in growth control and cancer. J Cell Physiol 199, 330-358, 2004.

20

Schaerer-Brodbeck, C. and A. Barberis, Coupling homologous recombination with growth selection in yeast: a tool for construction of random DNA sequence libraries. Biotechniques, 37(2): p. 202-206, 2004.

Stoica GE. et al. Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. The Journal of Biological Chemistry 276(20), 16772-16779, 2001.

30

Stoica GE. et al. Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. The Journal of Biological Chemistry 277 (39), 35990-35998, 2002.

【 0 1 2 0】

40

【化 2 - 6】

Weber D. et al. Pleiotrophin can be rate-limiting for pancreatic cancer cell growth. Cancer Research 60, 5284-5288, 2000.

Wellstein et al., A Heparin-binding Growth Factor Secreted from Breast Cancer Cells Homologous to a Developmentally Regulated Cytokine. JBC Vol 267, p2582, 1992.

10

SWISSPROT: www.expasy.org

www.emedicine.com/med/topic2692.htm

(glioblastoma)

www.emedicine.com/MED/topic3205.htm (ALCL)

【図面の簡単な説明】

【 0 1 2 1】

20

【図 1】図 1 は、用いたヒト A L K タンパク質の図を示す。s c F v 結合剤に関する 2 ハイブリッドスクリーニングにおいて、P T N 結合性部位（破線（d a s h e d））の 1 6 アミノ酸ペプチドをエピトープとして用いる。

【図 2】図 2 は、二次結合剤として E S B A 5 2 1 を、そして三次結合剤として s c F v のセットを得た、V H C D R 3、V L C D R 3 および V H C D R 2 部分の段階的ランダム化を示す（表 1 を参照されたい）。X は任意のアミノ酸残基を表す。

【図 3】図 3 は、改善された s c F v の結合特性を、s c F v が派生したフレームワークのものに比較する、E L I S A 実験を示す。

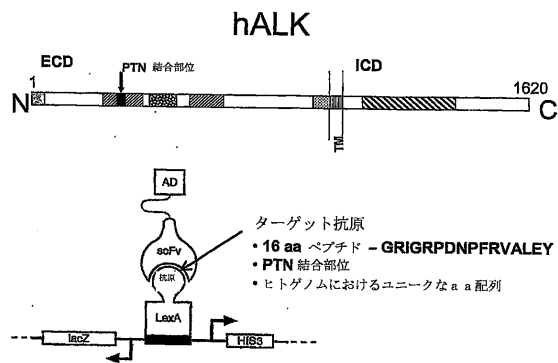
【図 4】図 4 は、E S B A 5 2 1（左のパネル）およびポリクローナル A L K 特異的抗体（右のパネル）を用いた、一過性トランスフェクション H e L a 細胞の免疫染色を示す。中央のパネル：光学顕微鏡によって可視化された同じ細胞。

30

【図 5】図 5 は、改善された三次結合剤に E S B A 5 1 2 を比較する、E L I S A 実験を示す。

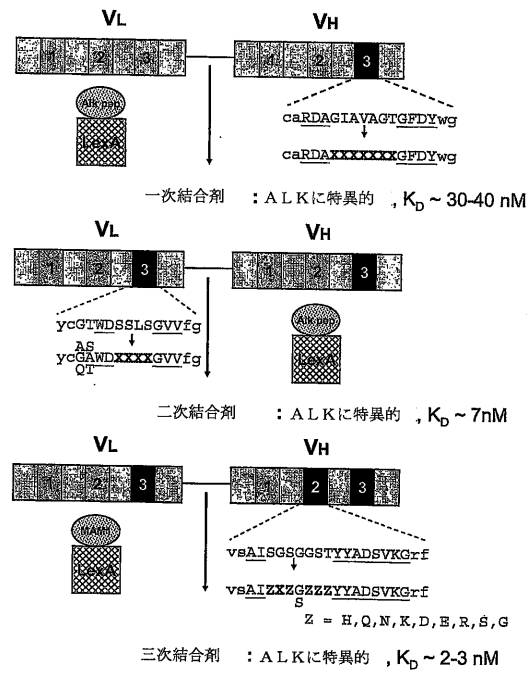
【図 1】

図 1



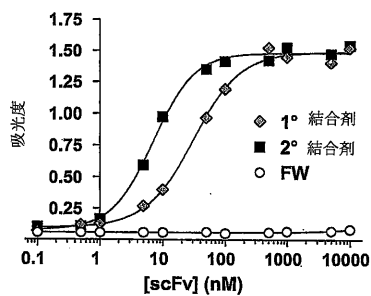
【図 2】

図 2



【図 3】

図 3

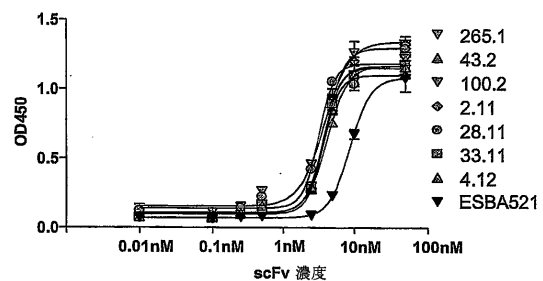


ELISA: GST-ALK ペプチド

 K_d 1° 結合剤: 31.0 ± 1.3 nM2° 結合剤: 7.2 ± 1.4 nM \rightarrow ESBA521

【図 5】

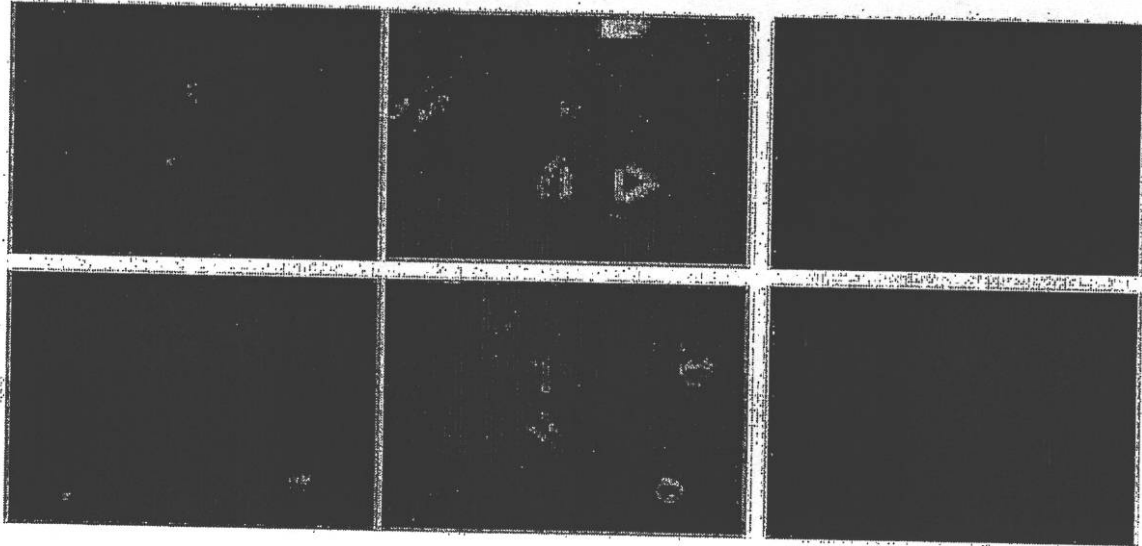
図 5



【図 4】

図 4

ヒト ALK



ESBA521

ポリクローナル AB

【配列表】

0005431920000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 39/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
		A 6 1 P 35/00	

(72)発明者 アオフ・デア・マウア, エイドリアン
 スイス国 8 9 5 3 ディーティコン, パーデナーシュトラッセ 1 9 アー
 (72)発明者 リヒトレン, ペーター
 スイス国 8 1 3 6 ガッティコン, オプストガルテンシュトラッセ 1 6
 (72)発明者 バルベリス, アルチャーデ
 スイス国 6 7 1 8 オリヴォネ, ソラリオ

審査官 小暮 道明

(56)参考文献 米国特許出願公開第2001/0021505 (US, A1)
 特表2004-504007 (JP, A)
 特表2006-508638 (JP, A)
 AUF DER MAUR A, METHODS, 米国, ACADEMIC PRESS INC., 2004年10月, V34 N2, P215-224
 STOICA GERALD E, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 米国, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL BIOLOGISTS, 2002年 9月27日, V277 N39, P35990-35998
 STOICA G E, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 米国, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, 2001年 5月18日, V276 N20, P16772-16779
 AUF DER MAUR A, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 米国, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL BIOLOGISTS, 2002年11月22日, V277 N47, P45075-45085

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 1 2 N 1 5 /
 C 0 7 K
 C A p l u s / M E D L I N E / W P I D S / B I O S I S (S T N)
 U n i P r o t / G e n e S e q