

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4488746号
(P4488746)

(45) 発行日 平成22年6月23日(2010.6.23)

(24) 登録日 平成22年4月9日(2010.4.9)

(51) Int.Cl.

F 1

C 07 K	16/30	(2006.01)	C 07 K	16/30	Z N A
C 12 N	5/10	(2006.01)	C 12 N	5/00	1 O 2
C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	A
C 12 N	1/15	(2006.01)	C 12 N	1/15	
C 12 N	1/19	(2006.01)	C 12 N	1/19	

請求項の数 20 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-571313 (P2003-571313)
 (86) (22) 出願日 平成15年2月20日 (2003.2.20)
 (65) 公表番号 特表2005-534615 (P2005-534615A)
 (43) 公表日 平成17年11月17日 (2005.11.17)
 (86) 國際出願番号 PCT/IT2003/000098
 (87) 國際公開番号 WO2003/072608
 (87) 國際公開日 平成15年9月4日 (2003.9.4)
 審査請求日 平成18年2月15日 (2006.2.15)
 (31) 優先権主張番号 60/359,299
 (32) 優先日 平成14年2月26日 (2002.2.26)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 PD 02003

前置審査

(73) 特許権者 591043248
 シグマータウ・インドゥストリエ・ファル
 マチエウチケ・リウニテ・ソシエタ・ペル
 ・アチオニ
 S I G M A - T A U I N D U S T R I E
 F A R M A C E U T I C H E R I U N
 I T E S O C I E T A P E R A Z I
 O N I
 イタリアOO144ローマ、ピアレ・シャ
 ケスペアレ47番
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗ヒトテネイシンモノクローナル抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

軽鎖および重鎖可変部配列がそれぞれ配列番号1および配列番号2であるモノクローナル抗-ヒトテネイシン抗体またはヒトテネイシンCのEGF-様リピート中の抗原性エピトープに結合するそのタンパク分解断片。

【請求項 2】

さらにマーカーおよび/または診断薬を含む請求項1の抗体またはその断片。

【請求項 3】

請求項1または2の抗体またはその断片の組換え誘導体であって、マウス定常部がヒト対応物または生物学的または薬理学的に活性な部分と置換されている誘導体、ここで該生物学的に活性な部分はアビジンファミリーのメンバー、G-CSFおよびGM-CSFからなる群から選択され、該薬理学的に活性な部分は毒素、スーパー抗原、およびサイトカインからなる群から選択される。

10

【請求項 4】

請求項1または2の抗体またはその断片の接合体誘導体であって、生物学的または薬理学的に活性な部分が該抗体またはその断片に結合している誘導体、ここで該生物学的に活性な部分はG-CSFおよびGM-CSFからなる群から選択され、該薬理学的に活性な部分は毒素、スーパー抗原、サイトカイン、抗腫瘍薬および放射性同位元素からなる群から選択される。

【請求項 5】

20

軽鎖可変部配列が配列番号 9、11、および 13 のアミノ酸配列を含み、重鎖可変部配列が配列番号 15、17、および 19 のアミノ酸配列を含むモノクローナル抗 - ヒトテネイシン C 抗体またはその断片であって、ヒトテネイシン C の EGF - 様リピート中の抗原性エピトープに結合する抗体または断片。

【請求項 6】

請求項 1 - 5 のいずれかの抗体、またはその断片または組換え誘導体または接合体誘導体の、ビオチン化誘導体。

【請求項 7】

アドバンスドバイオテクノロジーセンターに 2002 年 1 月 29 日にブダペスト条約に従って寄託され、受託番号が P D 0 2 0 0 3 である、モノクローナル抗 - ヒトテネイシン抗体を产生するハイブリドーマ細胞株。 10

【請求項 8】

請求項 7 のハイブリドーマによって產生されるモノクローナル抗体。

【請求項 9】

請求項 7 のハイブリドーマを培養する工程および該抗体を単離する工程を含む請求項 1 の抗体の調製方法。

【請求項 10】

請求項 1 - 5 のいずれかの抗体、またはその断片または組換え誘導体または接合体誘導体、または請求項 6 のビオチン化誘導体を含む、テネイシンを発現する疾患の検出のための診断用組成物。 20

【請求項 11】

該疾患が腫瘍である請求項 10 の組成物。

【請求項 12】

該腫瘍が、神経膠腫、乳癌、肺癌、線維肉腫および扁平上皮癌からなる群から選択される請求項 11 の組成物。

【請求項 13】

請求項 1 - 5 のいずれかの抗体、またはその断片または組換え誘導体または接合体誘導体または請求項 6 のビオチン化誘導体がインビボイメージング技術に使用される請求項 10 - 12 のいずれかの組成物。

【請求項 14】

5 つのバイアルから構成され、第一のバイアルが請求項 6 のビオチン化誘導体を含み、第二のバイアルがアビジンを含み、第三のバイアルがビオチン化アルブミンを含み、第四のバイアルがストレプトアビジンを含み、第五のバイアルが放射標識化ビオチンまたはビオチン誘導体を含む治療用キット。 30

【請求項 15】

該 5 つのバイアルがヒト注射に好適なものである請求項 14 の治療用キット。

【請求項 16】

請求項 1 - 5 のいずれかの抗体またはその断片または組換え誘導体または接合体誘導体をコードする DNA。

【請求項 17】

請求項 16 の DNA を含むベクター。 40

【請求項 18】

請求項 17 のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 19】

請求項 1 - 5 のいずれかの抗体またはその断片または組換え誘導体または接合体誘導体を、第二のテネイシン - 特異的抗体と組み合わせて含む、循環しているテネイシンレベルの測定のためのサンドイッチアッセイ用診断キット。

【請求項 20】

第二の抗体がテネイシンの第二の抗原性エピトープに結合する条件下でのサンドイッチ E L I S A インビトロアッセイにおける第二のテネイシン - 特異的抗体と組み合わせた請 50

求項 1 または請求項 2 の抗体であって、該インビトロ E L I S A アッセイが循環しているテネイシンレベルの測定に有用である抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、モノクローナル抗 - ヒトテネイシン抗体、それを得るための方法及び材料、該抗体のテネイシンを発現する腫瘍の診断および治療のためのそれぞれ診断手段および薬物の調製のための使用、および医薬分野への使用に好適な該抗体を含む材料に関する。

【背景技術】

【0002】

腫瘍療法の特異性は、治療の成功の判定においてしばしば律速段階となる。実際、毒作用の発生及び特定の抗癌剤の耐容性の低下はその使用および患者の生活の質を制限する。

【0003】

毒性の低減は癌細胞の治療の選択性に直接関係する。モノクローナル抗体は、腫瘍の特異的標的化のための理想的な手段であり、アビジン / ビオチン増幅システムと組み合わせると、非常に強力かつ選択性的な腫瘍部位への活性部分の送達手段を構成する。

【0004】

テネイシンは、細胞外マトリックスタンパク質の 1 つであり、胚発生の間に部位制限性発現を示し、成体組織においては創傷治癒および腫瘍形成、ならびに新規に形成された腫瘍血管においてみられる。テネイシンは正常な成体組織には発現していないが、様々な固形腫瘍のストローマにおいて発現している。例えば、神経膠腫(Burdon, et al., Cancer Res. 43:2796-2805, 1983)、乳癌(Chiquet-Ehrismann, et al., 1986)、肺癌(Natali et al., Int'l. J. Cancer 54:56-68, 1989)、線維肉腫および扁平上皮癌(Ramos D.M. et al., Int'l. J. Cancer 75:680-687, 1998)など。テネイシンは神経膠腫にはみられるが、正常な脳組織にはみられない。テネイシンについては、国際特許出願第 WO 92 / 04464 号 (Wistar)、および関連する引用文献を参考されたい。

【0005】

欧州特許第 0 4 9 6 0 7 4 号の教示に基づいて、G. Paganelli らは腫瘍の全身的および局所的治療のための三段階プレ標的化 (pre-targeting) アプローチを開発した(Cremonesi M. et al., Eur. J. Nucl. Med. 26(2):110-120, 1999; Paganelli G. et al., Eur. J. Nucl. Med. 26(4):348-357, 1999; Paganelli G. et al., Cancer Biother. & Radiopharm. 16(3):227-235, 2001)。

【0006】

三段階プレ標的化方法についての別の文献としては、国際特許出願第 WO 94 / 04702 号および米国特許第 5 5 7 8 2 8 7 号がある。

【0007】

三段階プレ標的化治療は、ビオチン化抗 - テネイシンモノクローナル抗体、ストレプトアビジン、および⁹⁰Y - 標識化ビオチンの静脈内逐次投与とそれにともなう 2 回のアビジンおよびビオチン化アルブミンの追跡投与 (それぞれストレプトアビジンおよび⁹⁰Y - 標識化ビオチンの前) に基づき、それによって非特異的バックグラウンドが低減される。Paganelli らの三段階プレ標的化アプローチの選択性は、抗 - テネイシンモノクローナル抗体の使用に依存する。細胞外マトリックスの標的化は、腫瘍細胞抗原の標的化と比較して、腫瘍細胞の抗原の変化によって影響されないという利点を示し、したがって、抗 - 腫瘍療法に理想的な標的化である。

【0008】

三段階プレ標的化治療の用量および投与時期は最適腫瘍 / 非腫瘍分布比を達成するために固定されてきた。48 のグリア芽細胞腫 (GBM) または未分化星状腫 (AA) 患者から得たデータ (Paganelli らの研究に含まれる) は、実質的に毒性が無く、例外としてストレプトアビジンに対するアレルギー反応 (アビジンの使用によって克服されうる) がみられただけであることを示し、治療効果の予備的指標となる。実際、治療終了の 2 ヶ月後

10

20

30

40

50

に、25%の患者は腫瘍サイズの減少を示し(完全な応答(腫瘍減少 > 50%) = 6% ;部分的応答(腫瘍減少 < 50%) = 11% ;低い応答(腫瘍減少 < 25%) = 8%)、52%の患者では進行しなかった。総応答比は77%を超えた。患者のなかには、予測される余命が6ヶ月未満の者もいたが、その応答は1年以上続いた(Paganelli et al., 1999)。

【0009】

ビオチン化抗-テネイシン抗体の役割は、腫瘍部位に局在化させること、および続くアビジンと⁹⁰Y-ビオチンの蓄積を媒介するためにビオチンを表示することである。

【0010】

抗-テネイシン抗体は例えば、米国特許第5624659号(Duke University)、日本国特許第2219590号(Rikagaku)および上記の国際特許出願第WO92/04464号に開示されている。

【0011】

抗-テネイシン抗体は、Siri A. et al., Nucl. Acid Res. 19(3):525-531, 1991; Balza E. et al., FEBS 332:39-43, 1993に開示されており、その治療目的での使用については前述のCremonesi M. et al., Eur. J. Nucl. Med. 26(2):110-120, 1999; Paganelli G. et al., Eur. J. Nucl. Med. 26(4):348-357, 1999; Paganelli G. et al., Cancer Biother. & Radiopharm. 16(3):227-235, 2001に開示されている。当該技術分野において抗-テネイシン抗体の作成に用いるクローニングはBC4として知られている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本出願人は、BC4クローニングが工業的開発および制御目的には好適でないことをみいだした。それは機能性でない軽鎖(おそらく親ミエローマ由来)産生によるものであり、軽鎖の発現レベルはスケールアップ培養の圧力下で増加し、大規模な抗体精製を妨げる。

【課題を解決するための手段】

【0013】

(発明の概要)

このたび、上記問題を解決する抗-ヒトテネイシンモノクローナル抗体を見いだした。すなわち機能性でない軽鎖が発現せずにモノクローナル抗体が産生できる。

【0014】

それゆえこの抗体は、該抗体を得る方法、その治療、特に、腫瘍などのテネイシンの発現によって特徴づけられる疾患の治療に有用な薬物の調製のための使用とともに本発明の目的である。

【0015】

(発明の説明)

本発明は、さらにマーカーおよび診断薬を含んでいてもよい抗体および抗体断片、これら抗体および抗体断片を含む組成物、およびそれらを含む診断および治療用組成物、これらの治療および診断における使用ならびにかかる抗体および抗体断片の製造方法を提供する。

【0016】

本発明はまた、抗体および断片をコードするDNA、DNAを含むベクター、ベクターを含む宿主細胞、配列番号1および2のタンパク質をコードするDNAによってコードされるタンパク質；タンパク質および断片をコードするDNA；特異的(specific)CDRおよびCDRからなるかまたはCDRを含むタンパク質にも関する。

【0017】

本発明によると、該抗体は一つの態様において、軽鎖および重鎖可変部の配列がそれぞれ配列番号1および配列番号2であることによって特徴づけられる。これらの配列を図10および11に示す。簡潔に記載するため、本発明による好適な抗体をST2146と称する。本発明は本発明において例示されるようにST2146に関するものであるが、当

10

20

30

40

50

業者であれば本開示を読むことにより、S T 2 1 4 6 以外の類似の抗体および抗体断片、ならびにかかる類似の抗体の抗体断片が本発明の枠内で產生および使用することができるこことを理解されよう。かかる類似の抗体は当業者にとって合理的な実験量によって產生することができよう。

【 0 0 1 8 】

本発明はそれゆえテネイシンに特異的に結合する抗体または抗体断片または抗体キメラ(例えはマウス・ヒト・キメラ)あるいは免疫グロブリン分子を提供する。本発明は、S T 2 1 4 6 の可変軽鎖の C D R および / または S T 2 1 4 6 の可変重鎖の C D R の少なくとも 1 つを含む抗体または抗体断片または抗体キメラあるいは免疫グロブリン分子を提供する。本発明の抗体または抗体断片または抗体キメラあるいは免疫グロブリン分子は、抗体、F v 断片、F a b 断片、F (a b)₂ 断片、一本鎖抗体、あるいは多量体抗体のいずれであってもよい。本発明の抗体または抗体断片または抗体キメラあるいは免疫グロブリン分子は、I g M、I g D、I g G、I g A、またはI g E 分子のいずれであってもよい。
。

10

【 0 0 1 9 】

本発明は、配列番号 1、2、9、11、13、15、17、または 19 の少なくとも 1 つを含む抗体または抗体断片または抗体キメラあるいは免疫グロブリン分子を提供する。

【 0 0 2 0 】

本発明はさらに、本発明のアミノ酸配列(例えは、配列番号 1、2、9、11、13、15、17、または 19 の配列)をコードする核酸配列を提供する。それゆえ本発明は、本発明の抗体または抗体断片または抗体キメラあるいは免疫グロブリン分子をコードする DNA 配列を提供する。かかるDNA配列は配列番号 3、4、10、21、14、16、18 または 20 から選択される少なくとも 1 つのDNA配列またはサブ配列を含む。
。

20

【 0 0 2 1 】

別の態様は、本発明の抗体または抗体断片または抗体キメラあるいは免疫グロブリン分子産物をコードする精製核酸分子に関する。本発明の免疫グロブリン産物をコードする核酸分子は常套技術を用いて作ることができる。例えは、オリゴヌクレオチドはオリゴヌクレオチド合成機を用いて合成され、互いに連結されて本発明の免疫グロブリン産物をコードする機能的オープンリーディングフレームを形成する。核酸分子は、合成した後、核酸ベクターにクローニングすればよい。核酸ベクターは、例えは、プラスミド、コスミド、ファージミド、酵母プラスミド、ファージベクター、T I プラスミドなどが当該技術分野で知られている。ベクターは発現ベクターとすればよい。発現ベクターおよび発現システムはStratagene (La Jolla, Calif.)などから市販されている。
。

30

【 0 0 2 2 】

本発明の別の態様は、本発明の核酸を含む細胞に関する。細胞はトランスフェクションによって作ることができる。トランスフェクション方法は公知であり、原核および真核細胞のトランスフェクション用キットは市販されている(例えは、Stratagene, La Jolla, Calif.)。

【 0 0 2 3 】

本発明の別の態様は、本発明の抗体、抗体断片、抗体キメラあるいは免疫グロブリン産物の、疾患の検出又は診断に有用な手段のための使用に関し、疾患の検出又は診断は以下の工程を含む: 対象からの組織サンプルと抗体、抗体断片、抗体キメラあるいは免疫グロブリン産物とテネイシン抗原の間の複合体の形成を可能とする条件下で接触させる工程、および該複合体の形成を判定する工程。
。

40

【 0 0 2 4 】

本発明の別の態様は、本発明の抗体、抗体断片、抗体キメラあるいは免疫グロブリン産物または本発明の核酸の、テネイシンを発現する疾患、特に腫瘍の治療用薬物の調製のための使用に関する。癌の免疫療法の方法は公知である。例えは、Old, L. J. Immunotherapy for Cancer, Scientific American, September 1996を参照されたい。

【 0 0 2 5 】

50

別の態様は、本発明の抗体、抗体断片、抗体キメラあるいは免疫グロブリン産物を含む治療用組成物に関する。本発明の免疫グロブリン産物は抗体、抗体断片、抗体キメラあるいは免疫グロブリン産物および医薬上許容される担体または希釈剤を含む組成物の形態で提供されてもよい。治療用組成物はヒトなどの哺乳類における疾患の治療に用いることができる。薬物は、治療上有効な量にて本発明の抗体、抗体断片、抗体キメラあるいは免疫グロブリン産物を哺乳類に投与されるものである。

【0026】

治療薬としての使用において、本発明の抗体、抗体断片、抗体キメラあるいは免疫グロブリン産物を薬剤と結合させてもよい。結合は共有結合によるものでも抗体・エピトープ結合によるものでもよい。例えば、抗体、抗体断片、抗体キメラあるいは免疫グロブリン産物を第二の抗体と架橋してもよく、ここで第二の抗体は薬剤に対するアフィニティーを有するものである。薬剤は細胞毒性薬剤であってもよい。本明細書において使用する「細胞毒性薬剤」の語は、細胞の機能を阻害または阻止する物質および/または細胞を破壊する物質を意味する。この語には放射性同位元素（例えば、I、Y、Pr）、化学治療薬、および毒素（例えば細菌、真菌、植物または動物由来の酵素的に活性な毒素やその断片）が含まれる。薬剤は化学治療薬であってもよい。化学治療薬とは癌の治療に有用な化学物質である。化学治療薬の例としては、アドリアマイシン、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド（「Ara-C」）、シクロホスファミド、チオテバ、ブスルファン、サイトキシン（Cytosine）、タキソール、メトトレキセート、シスプラチニン、メルファラン、ビンプラスチン、ブレオマイシン、エトポシド、イホスファミド、マイトマイシンC、ミトキサンtron、ビンクリスチン、ビノレルビン（Vinorelbine）、カルボプランチン、テニポシド（Teniposide）、ダウノマイシン、カルミノマイシン（Carminomycin）、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン類、エスペラミシン類（Esperamicins）（米国特許第4675187号を参照されたい）、メルファランおよびその他の関連する窒素マスターが挙げられる。薬剤はサイトカインであってもよい。サイトカインの語は、一の細胞集団から放出され、細胞間媒介物質として別の細胞に対して作用する、タンパク質の総称である。かかるサイトカインの例としては、リンホカイン類、モノカイン類および伝統的なポリペプチドホルモン類が挙げられる。サイトカイン類としては、成長ホルモン（例えば、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、およびウシ成長ホルモン）；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；リラキシン；プロリラキシン；糖タンパク質ホルモン（例えば、卵胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、および黄体形成ホルモン（LH））；肝臓増殖因子；線維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壞死因子；ミュラー（mullerian）-阻害物質；マウス生殖腺刺激ホルモン-関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮増殖因子；インテグリン；血小板産生因子（TPO）；神経増殖因子（例えば、NGF）；血小板-増殖因子；トランスフォーミング増殖因子（TGF）；インスリン-様増殖因子-Iおよび-II；エリスロポエチン（EPO）；骨誘導因子（osteoinductive factor）；インターフェロン（例えば、インターフェロン-アルファ、-ベータ、および-ガンマ、コロニー刺激因子（CSF）；顆粒球-マクロファージ-CSF（GM-CSF）；および顆粒球-CSF（G-CSF）；インターロイキン（IL）（例えば、IL-1、IL-1アルファ、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12）；腫瘍壞死因子；およびその他のポリペプチド因子（例えばLIFおよびキットリガンド（kit ligand）（KL））が挙げられる。本明細書で用いる場合、サイトカインの語は、天然のタンパク質または組換え細胞培養物由来のタンパク質および生物学的に活性な未変性配列サイトカインの均等物を含む。

【0027】

診断のためには、本発明の抗体、抗体断片、抗体キメラあるいは免疫グロブリン産物に標識（例えば、抗体に直接または間接的に結合した検出可能な化合物または組成物）を結合させてもよい。標識はそれ自体で検出可能なものであってもよいし（例えば、放射性同

10

20

30

40

50

位元素標識または蛍光標識)、酵素標識の場合、検出可能な基質化合物または組成物の化学変化を触媒するものであってもよい。

【0028】

本発明はまた、CDRの配列において1または複数のアミノ酸を突然変異させることによる開示されたCDRの突然変異体の作成も含む。CDRの適当な位置のーアミノ酸置換により十分にアフィニティーを上昇させることができることが知られている。研究者らは部位特異的突然変異誘発を用いてある種の免疫グロブリン産物のアフィニティーを約10倍上昇させた。このCDRの突然変異による抗体のアフィニティーを増減する方法は一般常識である(例えば、Chapter 23、Paul、W. E.、Fundamental Immunology、Raven Press、NY、N.Y. 1993を参照されたい)。したがって、結合アフィニティーまたは特異性を増減させるための本発明のCDRのアミノ酸の置換、欠失、または付加もまた本発明に含まれる。10

【0029】

本発明のさらなる態様は、腫瘍(例えば囊胞性脳腫瘍、神経膠腫、乳癌、肺癌、線維肉腫または扁平上皮癌)を患う固体の治療薬の提供である。これには腫瘍、例えば囊胞性脳腫瘍(テネイシンを発現する一例)を患うヒト対象への治療上有効量の本発明のテネイシンに結合する抗体、抗体断片、抗体キメラあるいは免疫グロブリン産物の投与を伴う。投与工程は、腫瘍の窩洞に抗体を沈着させることにより行えばよい。

【0030】

本明細書においてまた、固体腫瘍の治疗方法を開示し、該方法は以下の工程を含む：第一に、患者であるヒト対象の固体組織器官(例えば脳)から固体腫瘍(テネイシンを発現する一例)を取り出す；次いで固体腫瘍が取り出された位置において対象の器官に封入された(enclosed)切除窩洞を形成する；そして、対象に抗腫瘍薬剤、例えば固体腫瘍の細胞に選択的に毒性である本発明の抗体、抗体断片、抗体キメラあるいは免疫グロブリン産物(例えば、テネイシンに結合する抗体)を治療上有効量投与する。本発明の一つの態様において、投与工程は切除窩洞に抗腫瘍薬剤を沈着させることによっておこなう。20

【0031】

本発明の別の目的は、ヒトテネイシンCのEGF-様リピートにある抗原性エピトープに結合する該抗体のタンパク分解断片である。本発明の明細書の記載において、抗体断片とはヒトテネイシンCのEGF-様リピートにある抗原性エピトープに結合する断片を意味する。30

【0032】

本発明の別の態様において、抗体およびその断片はさらにマーカーおよび/または診断薬を含んでもよい。該マーカーおよび/または診断薬は本発明の関与する分野の当業者に周知である。

【0033】

本発明の好適な態様によると、該抗体またはそのタンパク分解断片はビオチン化されたものである。

【0034】

本発明の別の目的はcST2146と称する該抗体を產生するハイブリドーマ細胞系である。40

【0035】

ハイブリドーマ細胞系は、アドバンスドバイオテクノロジーセンター(Advanced Biotechnology Center)、L.go Rosanna Benzi、10 16132 GENOVA- Italyに2002年1月29日にプラベスト条約に従って寄託されており、受託番号はP D O 2 0 0 3である。

【0036】

本発明はまた抗体またはその断片をコードするDNA、特異的CDRおよびCDRを含むかそれからなるタンパク質、該DNAを含むベクターおよび該ベクターを含む宿主細胞も含む。

【0037】

10

50

本発明の別の目的は該抗体の組換え誘導体である。特に好ましい組換え誘導体はマウス定常部がヒト対応物で置換されたもの(Ferrer C. et al. J. Biotechnol. 52: 51-60、1996)またはマウス定常部が生物学的に活性な部分、例えば、アビジンファミリーのメンバー(Manuel L. et al., J. Immunol. 163: 4421-4426、1999)、腫瘍指向性免疫学的エフェクターの刺激に有用な増殖因子(例えば、G-CSF、GM-CSF)で置換されたもの、あるいはマウス定常部が薬理学的に活性な部分、例えば、毒素、スーパー抗原、サイトカインまたはその他の抗腫瘍治療効力の増強に有用なタンパク質で置換されたものである(Di Massimo A.M. et al., British J. Cancer 75(6):822-828、1997; Parente D. et al., Anticancer Research 17(6A):4073-4074、1997)。

【0038】

10

該組換え誘導体を得る方法は当該技術分野で周知である。

【0039】

本発明の別の目的は該抗体の接合体(conjugate) 誘導体である。

【0040】

特に好適な接合体誘導体は常套方法によって抗体に生物学的に活性な部分が結合したものである。生物学的に活性な部分の例は、アビジンファミリーのメンバー、腫瘍指向性免疫学的エフェクターの刺激に有用な増殖因子(例えば、G-CSF、GM-CSF)であり、薬理学的に活性な部分は例えば、毒素、スーパー抗原、サイトカインまたはその他の抗腫瘍治療効力の増強に有用なタンパク質、抗腫瘍薬、放射性同位元素などである。

【0041】

20

本発明によると、モノクローナル抗-ヒトテネイシンまたはその断片の組換え誘導体または接合体は「誘導体」とも称される。

【0042】

本発明のもっとも好適な態様において、抗体およびその断片以外では、その誘導体もビオチン化されている。

【0043】

本発明のさらに別の目的は上記抗体を產生するハイブリドーマ細胞系である。該ハイブリドーマはアドバンスドバイオテクノロジーセンターに2002年1月29日にブダペスト条約に従って寄託されており、受託番号P D 0 2 0 0 3である。

【0044】

30

本発明のさらなる目的として、モノクローナル抗体の調製方法が提供され、該方法は、上記ハイブリドーマ細胞系を培養する工程と抗体を単離する工程を含む。

【0045】

本発明の別の目的は、テネイシンを発現する疾患、特に腫瘍の治療用の薬物の調製のためのモノクローナル抗体である抗-ヒトテネイシンの使用である。

【0046】

テネイシンを発現する腫瘍としてはこれらに限定されるわけではないが、神経膠腫、乳癌、肺癌、線維肉腫および扁平上皮癌が挙げられる。

【0047】

本発明のさらに別の態様は、腫瘍の放射免疫療法用の薬物であり、これはテネイシンを発現する腫瘍を患う対象に投与され、該モノクローナル抗体またはタンパク分解断片あるいはその誘導体を含む。好適な態様において、該モノクローナル抗体またはタンパク分解断片あるいはその誘導体はビオチン化されており、より好適な態様において、薬物は放射免疫療法に適したものであり、特に三段階プレ標的化方法の実施に適したものである。この方法については、例えば欧洲特許第0496074号、European Journal of Nuclear Medicine Vol.26, No 4; April 1999; 348-357 および米国特許第5968405号などの文献に記載されている。この後者の態様において、本発明による薬物はキットの形態とすればよく、該キットは5つのバイアルから構成され、ここで第一のバイアルは、ビオチン化抗体またはその断片あるいは誘導体を含み；第二のバイアルはアビジンを含み、第三のバイアルはビオチン化アルブミンを含み、第四のバイアルはストレプトアビジンを含み

40

50

、第五のバイアルは放射標識化ビオチンまたはビオチン誘導体を含む。このような種類のキットは、European Journal of Nuclear Medicine Vol.26、No 4; April 1999; 348-357において提供されている。アビジンには、アビジン、ストレプトアビジン、PEG - アビジンまたはPEG - ストレプトアビジン、ジ - またはポリアビジンあるいはジ - またはポリストレプトアビジンが含まれる。放射標識化ビオチンには放射性核種が含まれ、例えば、欧州特許第0496074号に開示されたものであり、好ましくは⁹⁰Yである。ビオチン誘導体は、例えば国際特許出願第WO02/066075号に開示されている。このような種類のキットは、European Journal of Nuclear Medicine Vol.26、No 4; April 1999; 348-357において開示されている。好ましくはバイアルはヒト注射に適したものである。

10

【0048】

本発明の抗体の組換え誘導体およびその接合体は常套方法により腫瘍療法に用いられる。本発明の抗体およびその断片、誘導体ならびに接合体はテネイシン - 関連腫瘍、特に免疫療法による治療に好適に用いられるが、放射免疫療法が本発明の好適な態様である。

【0049】

ビオチン化形態の抗体またはその断片を含む、特定の容器、好ましくは注射に好適なバイアルの形態の容器は、本発明のさらなる目的である。

【0050】

本発明の別の態様において、治療用キットにおいて、ビオチン化抗体は別の優先的にA-D断片に向けられたテネイシン - 特異的抗体と組み合わされる。あるいはビオチン化抗体は他の腫瘍特異的抗体と組み合わされる。かかる種類のキットに関する一般的教示は、欧州特許第0496074号、European Journal of Nuclear Medicine Vol.26、No 4; April 1999; 348-357および米国特許第5968405号に提供されている。

20

【0051】

特に、本発明には容器も含まれ、所望により容器は複数の区画を含み、かかる容器はビオチン化抗体またはその断片あるいは誘導体、バッファーおよび三段階プレ標的化方法での治療用キットでの使用に好適な試薬を含む。

【0052】

本発明の別の目的は、モノクローナル抗体またはその断片、あるいはその組換え誘導体または接合体あるいはそれらのビオチン化誘導体の診断手段の調製のための使用であり、ここで診断手段はテネイシンを発現する疾患を検出するためのものであり、特に腫瘍のインビボイメージングのためのものである。

30

【0053】

本発明の特別の態様において、該モノクローナル抗体またはその断片あるいは誘導体は第二のテネイシン - 特異的抗体と組み合わされて診断キットの生産のためのサンドイッチアッセイにおいて用いられる。診断キットは、循環しているテネイシンレベルを測定するためのものである。サンドイッチアッセイは、例えば、第二の抗体がテネイシンの第二の抗原性エピトープに結合する条件下でのELISAインビトロアッセイであり、該インビトロELISAアッセイは循環しているテネイシンレベルの測定に有用である。

【0054】

40

抗体またはその断片あるいは誘導体を含む診断用または治療用キットは本発明のさらなる目的である。

【0055】

これらのおよびその他の本発明の目的は以下の実施例および図面による詳細な説明において詳しく開示される。

【0056】

(発明の詳細な説明)

以下の実施例において詳細に説明するように、ST2146は対応するハイブリドーマ細胞クローンcST2146から得られる。

【0057】

50

本発明の工業的側面に関しては、本明細書において開示する抗体は、この技術分野で通常行われているように医薬組成物または診断キットとして好適に製剤することができる。

【0058】

医薬組成物はこの技術分野において常套のものであり、当業者によって基本的知識に基づいて製造することができる。医薬組成物の例は本発明において引用する参考文献に例示されている。診断キットについても同様である。腫瘍の放射免疫療法用のキットにおいて特に好適なものは、上記 Paganelli et al の文献および欧州特許第 0496074 号に開示されている。

【0059】

少なくとも 1 つの医薬上許容される賦形剤および / または媒体と混合して抗体および / またはその断片および / またはその組換え誘導体および / またはその接合体を含む医薬組成物も本発明の枠内に含まれる。

【0060】

以下の実施例によってさらに詳細に本発明を説明する。

【実施例 1】

【0061】

B C 4 の特異性を有するが機能性でない軽鎖を発現しない新規なハイブリドーマ細胞クローンを作成するために、B a l b / c マウスを p T n 2 8 大腸菌ファージ可溶化液で免疫した。p T n 2 8 は B C 4 エピトープを含むことが以前に示されているヒトテネイシンの E G F - 様リピートの断片をコードする g t 1 1 組換えクローンである (Balza E. et al., 1993)。ヒトテネイシン C の模式図、関連する組換え抗原性断片および試薬、ならびに B C - 4 様抗体の作成に用いた戦略を図 1 に示す。p T n 2 8 で免疫した脾細胞を標準的方法によって S p 2 / 0 A g 1 4 非産生性ミエローマ細胞と融合させ (Cianfriglia M. et al., Methods Enzymol. 121:193210, 1986)、ハイブリドーマ集団を S K - M E L - 2 8 (ヒトメラノーマ細胞系) で精製されたテネイシンに対する E L I S A でスクリーニングした。テネイシン特異的ハイブリドーマを 2 回の F C S 含有培地、3 回のタンパク質非含有培地での限界希釈によりクローニングした (Animal Derived Component Free Medium Cyclone, HyQ^R Perbio)。c S T 2 1 4 6 / D 3 d / F 6 e サブクローンを c S T 2 1 4 6 マスター細胞バンク (M C B) およびワーキング細胞バンク (W C B) の產生のために選択した。

【0062】

S T 2 1 4 6 参照物質の产生は、2 L のバイオリアクター中で c S T 2 1 4 6 ハイブリドーマ細胞を培養することにより行い、c S T 2 1 4 6 ポスト产生細胞バンク (P P C B) の安定性を F A C S 分析および限界希釈により確認した。S T 2 1 4 6 は I g G 2 b / k アイソタイプのマウス免疫グロブリンである。

【0063】

還元 S D S - P A G E 分析によって示されるように S T 2 1 4 6 は軽鎖組成については均質であった。該分析は重鎖はある程度不均一であることを示した。この観察はマウス I g G 2 b アイソタイプについて以前に報告されているような O - 結合型グリコシル化の可変性と矛盾しない (Kim H. et al., J. Biol. Chem. 269(16):12345-12350, 1994)。F C S 含有培地またはタンパク質 - 非含有培地から得た 3 つのバッチからの S T 2 1 4 6 重鎖のバンドパターンが一致することが観察された。S T 2 1 4 6 の重鎖のグリコシド化の可変性を該抗体をシリダーゼで消化することにより確認した。S T 2 1 4 6 を、HiTrap 脱塩カラム (Amersham-Pharmacia) によってバッファーを 1 0 m M リン酸ナトリウムバッファー (1 5 0 m M N a C l 含有、p H 6 . 4) に交換した。M a b をセントリコン (centrificons) 1 0 0 , 0 0 0 M W C O (Millipore) によって終濃度約 1 m g / m l に濃縮し、1 . 5 U / m l のシリダーゼ (Sigma) で 3 7 ℃ で 2 4 時間消化した。サンプルを 1 2 % ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動にかけた。ゲル染色はクーマシーブリリアントブルーによって行った。予測されたように、この消化の結果、高分子量のバンドが除去された (図 2)。S T 2 1 4 6 の全体の均一性をヒドロキシルアバタイトクロマトグラフィ

10

20

30

40

50

ーによって確認したところ、S T 2 1 4 6 については単一のピークが示され、B C 4 については3つのピークが示された（図3、ここでB C 4について、完全に機能的なものはピーク3に対応する）。

【0064】

S T 2 1 4 6 はウェスタンプロット（図4）および競合的E L I S A（図5）によって示されるように、B C 4 の抗原性エピトープと同一ではないが非常によく関連するエピトープへの結合によってヒトテネイシンに結合する。図5において、ビオチン化B C 4 を様々な濃度のコンペティターとしてのB C 4 、S T 2 0 7 7 またはS T 2 1 4 6 と混合し、テネイシンコーティングしたプレートに入れた。結合はH R P - ストレプトアビジンおよび関連する色素生産性物質の添加により測定した。S T 2 0 7 7 はテネイシンのE G F - 様リピート中のエピトープを認識する抗体であり、該エピトープは部分的にB C 4 エピトープと共に通する。
10

【0065】

S T 2 1 4 6 の免疫反応性をB C 4 の完全に活性なピーク（ピーク3）と比較してE L I S Aによって評価した。図6は、最適抗原濃度のE L I S AにおいてO D 1 . 0 が得られるS T 2 1 4 6 の量（パネルA）はB C 4 の完全に反応性のピーク3のおよそ20分の1であり、B C 4 のおよそ100分の1であることを示す。この相違は、抗原制限条件下では劇的に増幅されパネルBに示すように、S T 2 1 4 6 のみが良好な免疫反応性を維持した。
20

【0066】

S T 2 1 4 6 のアフィニティーをBIAcoreにより評価した。S T 2 1 4 6 のK D は $1 . 4 \times 1 0 ^ { - 9 }$ であった（K a $3 . 0 \times 1 0 ^ { 5 }$; k d $4 . 1 \times 1 0 ^ { - 4 }$ ）。S T 2 1 4 6 のアフィニティーデータをB C 4 と比較した。B C 4 のK D は $4 . 9 \times 1 0 ^ { - 9 }$ (K a $1 . 9 \times 1 0 ^ { 5 }$; k d $9 . 3 \times 1 0 ^ { - 4 }$) であることが示された。
20

【0067】

ビオチン化された場合の免疫反応性の維持はプレ標的化に用いるモノクローナル抗体の基本的特性である。ビオチン化S T 2 1 4 6 の挙動を評価するため、様々な抗体：ビオチン比について調べ、ビオチン化抗体の免疫反応性をB C 4 およびS T 1 8 9 7 を比較してE L I S Aによって測定した。S T 1 8 9 7 はアフィニティーが低いテネイシン - 特異的モノクローナル抗体である。表1の結果は低いビオチン化（2 - 3 ビオチン / モル）はそのアフィニティーにかかわらずモノクローナル抗体の免疫反応性にわずかに影響を及ぼすことを示す。20ビオチン / モルまでの高いビオチン化は免疫反応性の減少と関連していた。この減少幅がより大きいほど、抗体アフィニティーは低い。
30

【0068】

【表1】

S T 2 1 4 6 のビオチン化研究

Mab	アフィニティー(nM)	%免疫反応性 モル ビオチン / 抗体			
		2-3	3.5-5	7-10	15-20
ST1897	10	84.8 +/- 1.3	62.3 +/- 12.4	26.65 +/- 13.8	9.45 +/- 9.26
BC4	4.9	82.4 +/- 11.5	74.4 +/- 9.3	67.2 +/- 12.3	12.6
ST2146	1.4	100	89.6 +/- 4.39	77.63 +/- 8.59	52.87 +/- 3.95

【0069】

%免疫反応性は、2 - 3回の独立した実験の平均 + / - 標準偏差である。

【0070】

ビオチン化ST2146のアフィニティーをBIAcoreによって測定した結果、結合したビオチン数にかかわらず実質的に維持された。

【0071】

様々な腫瘍（乳癌、神経膠腫、大腸癌）に対する免疫組織化学は、BC4とST2146が類似の選択性を有することを示した。

【0072】

腫瘍塊への局在化能力をしらべるためにビオチン化ST2146の薬理学的挙動を評価した。¹²⁵I - 標識化ST2146およびBC4ビオチン化抗体の体内分布研究を、図7のプロトコールにしたがってテネイシンを発現するヒト腫瘍を移植されたヌードマウスについて行った。マウスに皮下に0.1mlの無菌溶液中の4×10⁶のHT29ヒト大腸癌細胞を与えた。15日後、腫瘍塊がおよそ100mgとなったときに、5マウスの群に静脈内に¹²⁵I - 標識化BC4、ST2146または標準マウス免疫グロブリン(nM Ig)を0.1mlの無菌PBS中、10、2、0.5または0.1μg/マウスにて与えた。すべての抗体はビオチン化されており(7-10ビオチン/モル)、ST2146ビオチン化MabおよびBC4ビオチン化Mabはともに約80%の免疫反応性を示した。各動物には以下の量のCPMを与えた。

【0073】

【表2】

20

用量	BC4	ST2146	NM Ig
10 μg	632.000	570.000	577.000
2 μg	555.000	639.000	624.000
0.5 μg	310.000	401.000	382.000
0.1 μg	186.000	211.000	174.000

【0074】

30

図8の結果は、BC4とST2146はともに腫瘍塊に特異的に局在化することを示す。腫瘍部位における両抗体の量(%注射用量/組織グラムとして表す)は用量依存的であり、ST2146がより多く蓄積する傾向にあった。さらに、ST2146は図9に示すようにBC4と比較して良好な腫瘍/非腫瘍比を示した。

【0075】

カッパ軽鎖可変部を環状cDNAから以下のプライマーを用いて増幅した(5'-TGTCAAGA GCTTCAACAGGA (配列番号5)、5'-AAGATGGATACAGTTGGTGC (配列番号6))。これはM. Sassa no et al.、Nucl. Ac. Res. (1994) 22、1768-1769に記載のように抗体定常部にアニーリングする。

【0076】

40

ガンマ重鎖可変部を環状cDNAから以下のプライマーを用いて増幅した:オリゴマウス 2bCH1 GTCACTGACTCAGGGAAGTAGCC (配列番号7); オリゴマウス 2bCH3 GCAACGTGAG ACACGAGGGTCTG (配列番号8)。これはM. Sassa no et al. Nucl. Ac. Res. (1994) 22、1768-1769に記載のように抗体定常部にアニーリングする。

【0077】

PCRを以下の条件を用いて行った: 94 1分、60 1.5分、72 2分、30サイクル。

【0078】

増幅した断片をSma Iで切断したプラスミドpUC18に直接クローニングした。カッパ軽鎖を含む2つのクローンおよびガンマ重鎖可変部を含む4つのクローンを配列決定

50

した。配列決定はMWG Biotech、Germanyにて行った。両鎖を配列決定した。不明瞭な点はなかった。

【0079】

図10は、S T 2 1 4 6 可変軽鎖（V L）の配列を示す。

【0080】

図11は、S T 2 1 4 6 可変重鎖（V H）の配列を示す。

【0081】

B C 4 と比較した S T 2 1 4 6 の全体的な比較特徴付けにより S T 2 1 4 6 が以下の特徴を有することが示される。

- エピトープ特異性については B C 4 - 様のモノクローナル抗体である； 10
- 重鎖および軽鎖の組成については均質である；
- 重鎖グリコシル化については不均質である；
- B C 4 の不均一性から予測されるように免疫反応性については B C 4 より優れている；
- アフィニティーについては約 3 倍 B C 4 よりすぐれている；
- ビオチン化の際の免疫反応性の維持については B C 4 より優れている；
- 免疫組織化学における選択性については B C 4 と同様である；
- 腫瘍標的化については B C 4 より優れている。

【0082】

(参考文献)

Balza E., Siri A., Ponassi M., Caocci F., Linnala A., Virtanen I., Zardi L. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for different epitopes of human tenascin. FEBS 332:39-43, 1993. 20

Chinol M., Casalini P., Maggiolo M., Canevari S., Omodeo E.S., Caliceti P., Veronese F.M., Cremonesi M., Cholerio F., Nardone E., Siccardi A.G., Paganelli G. Biochemical modifications of avidin improve pharmacokinetics and biodistribution, and reduce immunogenicity. British Journal of Cancer 78(2): 189-197, 1998.

Cianfriglia M., Mariani M., Armellini D., Massone A., Lafata M., Presentini L. and Antoni G. Methods for high frequency production of soluble antigen-specific hybridomas; specificities and affinities of monoclonal antibodies obtained. Methods Enzymol 121:193-210, 1986. 30

Cremonesi M., Ferrari M., Chinol M., Stabin M. G., Grana C., Prisco G., Robertson C., Tosi G., Paganelli G. Three-step radioimmunotherapy with yttrium-90 biotin : dosimetry and pharmacokinetics in cancer patients. Eur J Nucl Med 26(2):110-120, 1999.

Di Massimo AM., Di Loreto M., Pacilli A., Raucci G., D'Alatri L., Mele A., Bolognesi A., Polito L., Stirpe F. and De Santis R. Immunoconjugates made of an anti EGF-receptor Monoclonal Antibody and Type 1 RIPs from Saponaria ocymoides or Vaccaria pyramidata. British J. Cancer 75(6):822-828, 1997 40

Parente D., D'Alatri L., Di Massimo AM., Saccinto MP., Novelli S., Pacilli A., Mele A. and De Santis R. Production and in vitro characterization of a recombinant immunotoxin made of a single chain anti-EGF receptor antibody and a type ribosome-inactivating protein (RIP) from filamentous fungus Aspergillus clavatus. Anticancer Research 17(6A):4073-4074, 1997

Kim H, Yamaguchi Y, Masuda K, Matsunage C, Yamamoto K, Irimura T, Takahashi N, K 50

ato K, Arata Y. O-glycosylation in hinge region of mouse immunoglobulin G2b. *J Biol Chem* 269(16):12345-12350, 1994.

Ferrer C., Anastasi A.M., Di Massimo A.M., Bullo A., Di Loreto M., Raucci G., Pacilli A., Rotondaro L., Mauro S., Mele A. and De Santis R. Expression and characterization of a mouse/human chimeric antibody specific for EGF receptor. *J. Biotechnol.* 52: 51-60, 1996

Manuel L. Penichet,* Young-Sook Kang, • William M. Pardridge, • Sherie L. Morrison,* and Seung-Uon Shin. An Antibody-Avidin Fusion Protein Specific for the Transferrin Receptor serves as a Delivery Vehicle for Effective Brain Targeting: Initial Applications in Anti-HIV Antisense Drug Delivery to the Brain 1. *J Immunol* 163: 4421?4426, 1999. 10

Paganelli G., Grana C., Chinol M., Cremonesi M., De Cicco C., De Braud F., Robertson C., Zurruda S., Casadio C., Zoboli S., Siccardi A. G., Veronesi U. Antibody-guided three step therapy for high grade glioma with yttrium-90 biotin. *Eur J Nucl Med* 26(4):348-357, 1999.

Paganelli G., Bartolomei M., Ferrari M., Cremonesi M., Broggi G., Maira G., Sturiale C., Grana C., Prisco G., Gatti M., Caliceti P., Chinol M. Pre-targeted loco-regional radioimmunotherapy with 90Y-biotin in glioma patients: Phase I study and preliminary therapeutic results. *Cancer Biother & Radiopharm* 16(3):227-235, 2001. 20

Parente D., D'Alatri L., Di Massimo AM., Saccinto MP., Novelli S., Pacilli A., Mele A. and De Santis R. Production and in vitro characterization of a recombinant immunotoxin made of a single chain anti-EGF receptor antibody and a type ribosome-inactivating protein (RIP) from filamentous fungus *Aspergillus clavatus*. *Anticancer Research* 17(6A):4073-4074, 1997 30

Ramos D.M. Chen B, Regezi J, Zardi L, Pytela R Tenascin-C matrix assembly in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 75:680-687, 1998.

Siri A., Carnemolla B., Saginati M., Leprini A., Casari G., Baralle F. and Zardi L. Human tenascin: primary structure, pre-mRNA splicing patterns and localization of the epitope recognized by two monoclonal antibodies. *Nucl Acid Res* 19(3):525-531, 1991.

【0083】

本明細書において引用されたすべての文献は引用によりその内容全体を本出願に含める。 40

【図面の簡単な説明】

【0084】

【図1】図1は、ヒトテネイシンC、関連する組換え抗原性断片および試薬、ならびにBC-4様抗体の作成に用いた戦略の模式図を示す。

【図2】図2は、シアリダーゼで抗体を消化することによるST2146重鎖の可変性のグリコシドの性質の確認を示す。

【図3】図3は、BC4に対するST2146の全体の均一性を示す。

【図4】図4は、BC4の抗原性エピトープと比較したヒトテネイシンエピトープに結合しているST2146のウェスタンプロットを示す（レーンDは空である）。

【図5】図5は、競合的ELISAを示す。ここでST2146はヒトテネイシンへの結 50

合において B C 4 と強く競合しており、 S T 2 0 7 7 は部分的な競合しか示さない。 S T 2 0 7 7 は S T 2 1 4 6 を作成する手順において得られたテネイシン特異的モノクローナル抗体である。 S T 2 0 7 7 は S T 2 1 4 6 同様に特異性を示したが（ヒトテネイシンの E G F - 様リピート領域）、 B C 4 / S T 2 1 4 6 エピトープを部分的にしか阻害しない抗原性エピトープに向けられたものである。

【図 6】図 6 は、 B C 4 の完全に活性なピークと比較した E L I S A による S T 2 1 4 6 の免疫反応性を示す。

【図 7】図 7 は、 S T 2 1 4 6 の体内分布研究のプロトコールを示す。
【図 8】図 8 は、 B C 4 と比較した S T 2 1 4 6 の体内分布を示す（ b i o t = ピオチン化； I R = E L I S A において 1 . 0 の O . D を得るための抗体量として表した免疫反応性）。
10

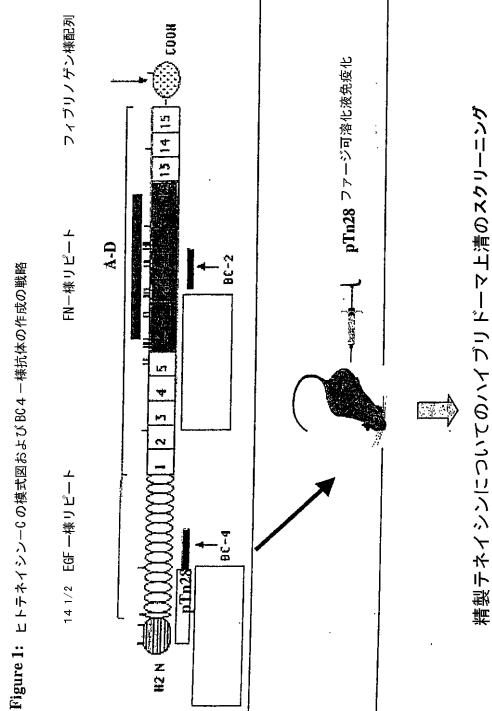
【図 9】図 9 は、 B C 4 と比較した S T 2 1 4 6 の腫瘍 / 非腫瘍比を示す。

【図 10】図 10 は、 S T 2 1 4 6 可変軽鎖（ V L ）の配列を示す（配列番号 1 （全長アミノ酸）、 3 （アミノ酸をコードする DNA ）、 9 （ C D R 1 の軽鎖アミノ酸）、 1 0 （ C D R 1 の軽鎖 DNA ）、 1 1 （ C D R 2 の軽鎖アミノ酸）、 1 2 （ C D R 2 の軽鎖 DNA ）、 1 3 （ C D R 3 の軽鎖アミノ酸）、 1 4 （ C D R 3 の軽鎖 DNA ）および 2 1 （全長 DNA ））。

【図 11】図 11 は、 S T 2 1 4 6 可変重鎖（ V H ）の配列を示す（配列番号 2 （全長アミノ酸）、 4 （アミノ酸をコードする DNA ）、 1 5 （ C D R 1 の重鎖アミノ酸）、 1 6 （ C D R 1 の重鎖 DNA ）、 1 7 （ C D R 2 の重鎖アミノ酸）、 1 8 （ C D R 2 の重鎖 DNA ）、 1 9 （ C D R 3 の重鎖アミノ酸）、および 2 0 （ C D R 3 の重鎖 DNA ）および 2 2 （全長 DNA ））。

20

【図 1】



【図 2】

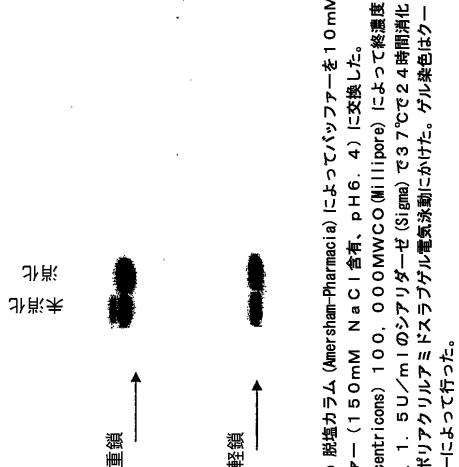
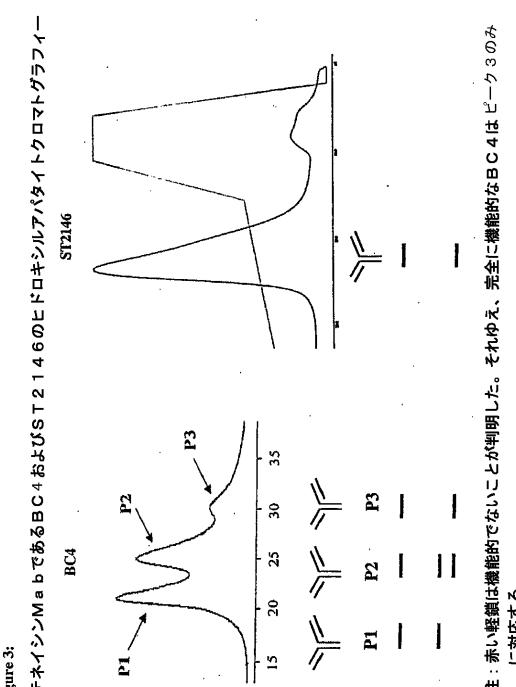


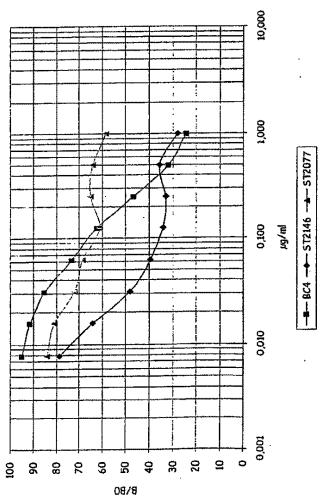
Figure 2: ST2146のシアル酸残基の消化

ST2146を、HiTrap 脱脂カラム (Amersham-Pharmacia) によってバッファーを 1.0 mM リン酸ナトリウムバッファー (15.0 mM NaCl 含有、 pH 6.4) に交換した。 Ma b をセントリコン (centrifugation) 100, 000 MWCO (Millipore) によって終濃度 約 1 mg / ml に濃縮し、1.5 U / ml のシリターゼ (Sigma) で 37 °C で 2.4 時間消化 した。サンプルを 1.2 % ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動にかけた。ゲル染色はクーマークリアントブルーによって行った。

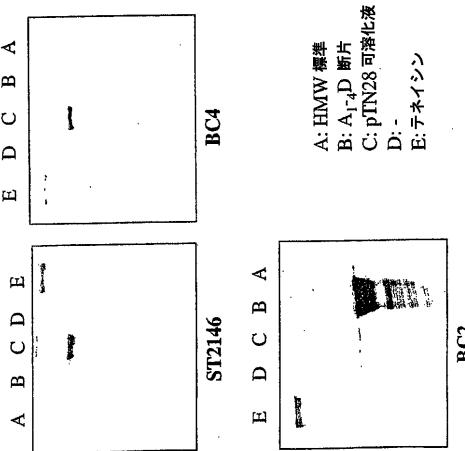
【図 3】

Figure 3:
抗テネイシンマ bであるBC4およびST2146のヒドロキシアルバタイトクロマトグラフィー

【図 5】

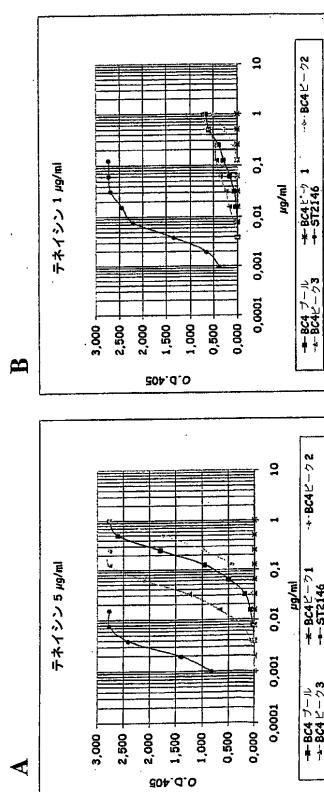
Figure 5:
ST2146 複合的ELISA

【図 4】



注：赤い星印は機能的でないことが判明した。それゆえ、完全に機能的なBC4はピーク3のみに対応する。

【図 6】

Figure 6:
ST2146 およびBC4の免疫反応性

【圖 7】



Figure 9: 脳梗塞されたヌードマウスにおけるST2146およびBC4ビオチン化Mabの腫瘍 / 非腫瘍比

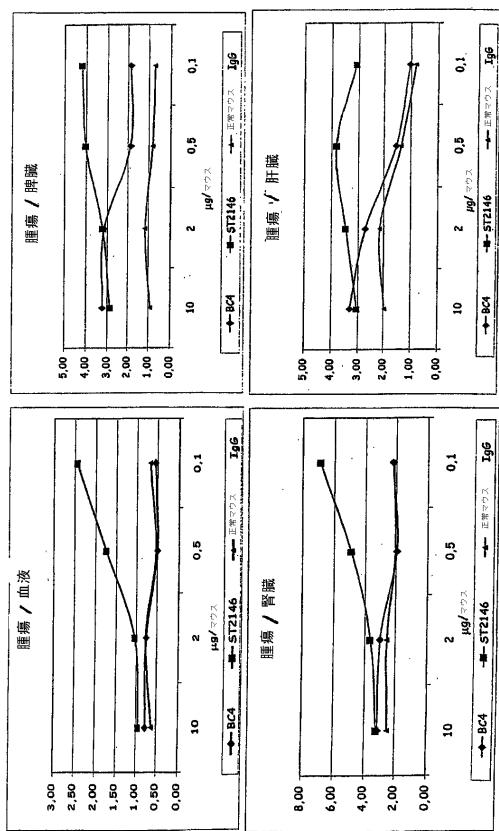


Figure 10: ST2146 軽鎖可変部 cDNA 配列および推定アミノ酸配列

ST2146-D3d-F6e カツバ軽銷サブダループ II

Figure 7: 脊髄移植されたヌードマウスのST 2146およびBC 4ビオチン化Mabの体内分布研究のプロトコール

Figure 8: 検査後植されたヌードウカスにおける SST 2146 指針(BG4 ピネルマ)の体内分布

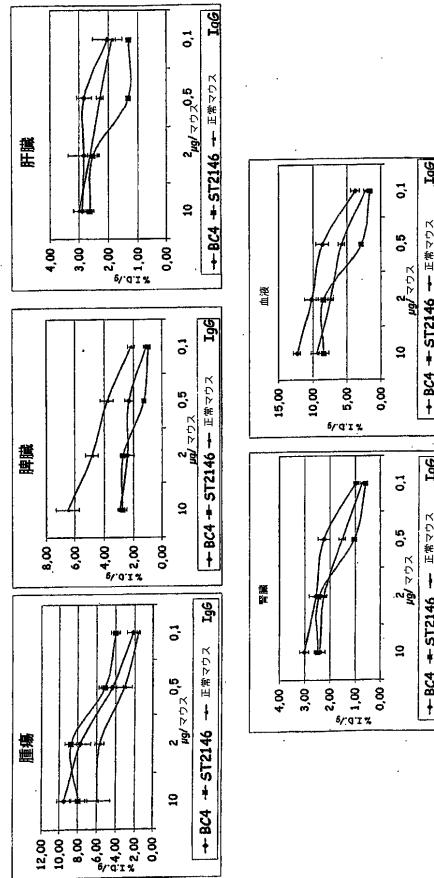


図 1 0

【図11】

Figure 11: ST2146 重鎖可変部 cDNA 配列および推定アミノ酸配列

ST2146 ガンマ重鎖サブグループ II A

【配列表】

0004488746000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
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 N 5/00 1 0 1
	C 1 2 P 21/08

(74)代理人 100106518

弁理士 松谷 道子

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(72)発明者 リタ・デ・サンティス

イタリア、イ-00040ポメツィア、ヴィア・ポンティーナ、キロメトロ30,400、シグマ
- タウ・インドゥストリエ・ファルマチェウチケ・リウニテ・ソシエタ・ペル・アチオニ内

(72)発明者 アンナ・マリア・アナスタシ

イタリア、イ-00040ポメツィア、ヴィア・ポンティーナ、キロメトロ30,400、シグマ
- タウ・インドゥストリエ・ファルマチェウチケ・リウニテ・ソシエタ・ペル・アチオニ内

審査官 中村 正展

(56)参考文献 米国特許第06335014(US, B1)

特開2002-234900(JP, A)

特開平02-219590(JP, A)

Eur J. Nucl. Med., 1999年, vol. 26, 348-357

FEBS Lett., 1993年, vol. 332, 39-43

Nucl. Acids Res., 1991年, vol. 19, 525-531

Int. J. Cancer, 1992年, vol. 52, 688-692

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/30

C12N 15/00-15/90

C12N 1/00- 1/38

C12N 5/00- 5/28

C12P 21/08

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)

PubMed

WPIDS(STN)

MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

CA/CONFSCI/SCISEARCH(STN)

UniProt/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq