世界知的所有権機関
国 際 事 務 局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C07K 16/18, 16/40, C12P 21/08, C12N 15/06, 5/20, G01N 33/577 // (C12P 21/08, C12R 1:91)	A1	(11) 国際公開番号 WO96/20217 (43) 国際公開日 1996年7月4日(04.07.96)

(21) 国際出願番号 PCT/JP95/02661
(22) 国際出願日 1995年12月25日(25.12.95)

(30) 優先権データ
特願平6/327328 1994年12月28日(28.12.94) JP

(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について)
大鵬薬品工業株式会社
(TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP]
〒101 東京都千代田区神田錦町1-27 Tokyo, (JP)
(72) 発明者;および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ)
宮寺和孝(MIYADERA, Kazutaka)[JP/JP]
〒890 鹿児島県鹿児島市上荒田町29-8 Kagoshima, (JP)
山田雄次(YAMADA, Yuji)[JP/JP]
〒359 埼玉県所沢市東狭山ケ丘2-2953-21 Saitama, (JP)
竹林勇次(TAKEBAYASHI, Yuji)[JP/JP]
〒891-01 鹿児島県鹿児島市上福元町5959-24 Kagoshima, (JP)
秋山伸一(AKIYAMA, Shin-ichi)[JP/JP]
〒891-01 鹿児島県鹿児島市皇徳寺台3-23-12 Kagoshima, (JP)

(74) 代理人
弁理士 有賀三幸, 外(ARUGA, Mitsuyuki et al.)
〒103 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号
共同ビル Tokyo, (JP)

(81) 指定国
AU, CA, KR, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title : MONOCLONAL ANTIBODY

(54) 発明の名称 モノクローナル抗体

(57) Abstract

A monoclonal antibody against a peptide which occurs in human thymidine phosphorylase and vascular endothelial cell growth factor originating in human platelets and contains amino acid sequences of SEQ ID NOS: 1 and 2; and a method of immunoassay of human thymidine phosphorylase and/or vascular endothelial cell growth factor originating in human platelet by using this monoclonal antibody. The monoclonal antibody recognizes human thymidine phosphorylase and vascular endothelial cell growth factor originating in human platelet and is useful in the diagnosis and treatment of various tumors, metastasis thereof, diseases accompanied by abnormal vascularization, etc.

（５７）要約

本発明はヒトのチミジンホスホリラーゼ及びヒト血小板由来血管内皮細胞増殖因子中に存在する配列番号１及び２のアミノ酸配列を含むペプチドに対するモノクローナル抗体及び当該モノクローナル抗体を用いるヒトチミジンホスホリラーゼ及び／又はヒト血小板由来血管内皮細胞増殖因子の免疫学的測定法である。

このモノクローナル抗体はヒトのチミジンホスホリラーゼ及びヒト血小板由来血管内皮細胞増殖因子を認識し、各種腫瘍及びその転移、血管新生の異常増殖を伴う疾患等の診断及び治療に有用である。

明　細　書

モノクローナル抗体

技術分野

本発明はヒトのチミジンホスホリラーゼ及び血小板由来血管内皮細胞増殖因子（ＰＤ－ＥＣＧＦ）の検出、すなわち各種腫瘍、血管の異常増殖を伴う疾患、例えば腫瘍の転移、リウマチ性関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児性網膜症、老人性黄斑部変性などの診断及び治療によるモニタリング、並びに薬剤等のドラッグデリバリーシステムに有用なモノクローナル抗体に関する。

技術背景

チミジンホスホリラーゼはチミジンの代謝に必須の酵素でヒト及び各種動物の種々の組織（肝臓、肺、小腸、大腸、胎盤など）での活性発現が報告されている〔Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔ．，５８，１５８７－１５９０（１９７７）及びＢｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ．，１０３４，１０７－１１３（１９９０）〕。また各種悪性腫瘍において、チミジンホスホリラーゼは正常組織と比較して活性の亢進することが報告されており〔Ｃｈｅｍ．Ｐｈａｒｍ．Ｂｕｌｌ．，３４，４２２５－４２３２（１９８６）〕、抗癌剤の標的酵素となっている。

また、血管の異常増殖の際には、ＰＤ－ＥＣＧＦは正常組織と比較して活性の亢進することが報告されており〔Ｎａｔｕｒｅ，３３８，５５７－５６２（１９８９）〕、血管の異常増殖を伴う疾患の指標となっている。

近年、ヒトチミジンホスホリラーゼはＰＤ－ＥＣＧＦと遺伝的に同一であることが報告されており〔Ｎａｔｕｒｅ，３３８，５５７－５６２（１９８９）、Ｎａｔｕｒｅ，３５６，６６８（１９９２）及びＪ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１１４，９－１４（１９９３）〕、チミジンホスホリラーゼ及びＰＤ－ＥＣＧＦの活性の測定は悪性腫瘍のみならず血管新生の異常増殖を伴う疾患、例えばリウマチ性関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児性網膜症、老人性黄斑部変性などの診断に有用である。

従来のヒトチミジンホスホリラーゼ及びＰＤ－ＥＣＧＦの活性の測定方法は、組織中のこれら酵素の活性を測定することで調べられていたため、組織を必要量摘出し粗酵素液を分画する必要があった。そのため手技的にも煩雑であるばかりではなく、細胞間レベルでの微細な比較はできず、実用面及び精度面で大きな問題があった。

発明の開示

従って、本発明の目的は、チミジンホスホリラーゼ／ＰＤ－ＥＣＧＦを特異的に測定でき、簡便で広く適用可能であって実用的価値のある手段を提供することにある。

そこで、本発明者らは鋭意研究を行った結果、ヒトチミジンホスホリラーゼ及びＰＤ－ＥＣＧＦタンパク中のペプチドを免疫原とするモノクローナル抗体を作製し、これがヒトチミジンホスホリラーゼ及びＰＤ－ＥＣＧＦを特異的に認識し、ヒトチミジンホスホリラーゼ及びＰＤ－ＥＣＧＦの活性が亢進している種々の疾患の診断に有用であることを見い出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は配列番号１のアミノ酸配列を有するペプチド及び配列番号２のアミノ酸配列を有するペプチド又はこれを抗原部位として認識されるペプチドに対するモノクローナル抗体を提供するものである。

また、本発明は上記モノクローナル抗体を用いるヒトチミジンホスホリラーゼ及び／又はＰＤ－ＥＣＧＦの免疫学的測定法を提供するものである。

図面の簡単な説明

図１は、本発明のモノクローナル抗体の反応特異性の結果を示す図である。

図２は、本発明のモノクローナル抗体と反応するヒト乳癌組織と隣接正常組織の発現を比較した結果を示す図である（３例）。

図３は、本発明のモノクローナル抗体の反応特異性のヒト大腸正常組織切片における免疫組織化学染色の結果を示す図である。

図４は、本発明のモノクローナル抗体の反応特異性のヒト大腸癌組織切片における免疫組織化学染色の結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

配列番号１のアミノ酸配列を有するペプチド及び配列番号２のアミノ酸配列を有するペプチドは、各々ヒトチミジンホスホリラーゼの一部であり、当該ペプチドを抗原部位として認識されるペプチドとしては、配列番号１又は２のアミノ酸配列を有するものであれば特に制限されないが、ヒトチミジンホスホリラーゼ、ＰＤ－ＥＣＧＦ、ヒトチミジンホスホリラーゼ又はＰＤ－ＥＣＧＦの一部であって配列番号１又は２のアミノ酸配列を含むペプチド、又はこれらのペプチドにキャリアタンパクを結合させたペプチドが挙げられる。該キャリアタンパクとしては、例えばグルタチオントランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、スカシガイのヘモシアニン（ＫＬＨ）等が挙げられる。

本発明のモノクローナル抗体は、例えば、前記ペプチドを抗原として認識する抗体を産生するクローンを培養することによって製造される。

このようなクローンは、通常の細胞融合法、すなわち、抗体産生細胞と骨髄腫細胞との間に融合ハイブリッドを形成させ、該ハイブリッドをクローン化し、前記ペプチドを抗原として認識する抗体を産生するクローンを選択することによって製造される。

ここで用いる抗体産生細胞としては、配列番号１又は２のアミノ酸配列を有するペプチド、これを抗原部位として認識されるペプチド又はこれらのペプチドとキャリアタンパクとの結合物を抗原として免疫させた動物からの脾細胞、リンパ節細胞及びＢリンパ球が例示される。

抗体産生細胞の調製は、常法に従って行われる。例えば、まず抗原を注射直前に完全もしくは不完全フロイントアジュバント中で乳化、懸濁させ、動物の皮下又は腹腔内に２～３週間毎に数回（好ましくは３回）注射を繰り返すことにより動物を免疫させる。免疫させる動物としてはマウス、ラット、ウマ、ヤギ及びウサギ等が例示される。抗原の静脈内投与による最終免疫より３～５日後、免疫動物から脾細胞などの抗体産生細胞を分取する。

骨髄腫細胞としては、マウス、ラット及びヒト等由来のものが使用されるが、上記抗体産生細胞と同種の動物由来であることが望ましい。例えば、マウス脾細

胞の融合の相手としてはP３UＩ及びSP－２／O－Ag１４〔Nature 277，131－133（1979）〕等のマウス骨髄腫細胞が用いられる。

細胞融合は、例えば、Nature 256，495－497（1975）に記載の方法や、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78，5122－5126（1981）に記載のUedaらの方法又はこれに準ずる方法によって行われ、通常、３０～５０％ポリエチレングリコール（平均分子量１０００～４０００）を用いて、３０～４０℃で、１～３分間程度反応させることによって行われる。より好ましくは、３０～５０％ポリエチレングリコール（平均分子量４０００）を用いて、３７℃で、１～３分間程度反応させることによって行われる。

細胞融合によって得られたハイブリドーマは、例えば、マイクロプレート中で培養し、HAT培地（ヒポキサンチン１００μM、アミノプテリン０．４μM、チミジン１６μMを含む基礎培地）等を用い、成育してくる細胞として選択される。更に選択されたハイブリドーマは抗原結合性を検定した上で、クローニングに付される。

すなわち、増殖の見られたウエルの培養上清中の抗体価を、例えば、抗原ペプチドをスクリーニング用抗原として用いたELISA（Enzyme－linked immunosorbent assay）法〔Miller, M. E., Lancet, 1, 665（1971）〕等の酵素抗体法によって測定し、更に、限界希釈法によってクローニングを行えばクローンが得られる。

このようにして得られたクローンを通常の動物細胞と同様に培養すれば、培地中に本発明のモノクローナル抗体が産生される。また、このクローンは、例えば、あらかじめ０．５mlのプリスタンを投与したBalb／cマウスの腹腔内へ移植することにより、７～１４日後にモノクローナル抗体を高濃度に含む腹水を産生するので、当該腹水より本発明モノクローナル抗体を採取することもできる。

クローンの培養液や腹水からの本発明モノクローナル抗体の回収は、IgGの精製方法として既知の方法、例えば、陰イオン交換体、ヒドロキシアパタイト、プロテインA又はG固定化カラム及びプロタミン固定化カラム等を用いた各種のカラムクロマトグラフィー、硫安分画法、PEG分画法、エタノール分画法及び

低張緩衝液沈殿法を応用することで、容易に達成される。

以上の如くして得られた本発明のモノクローナル抗体のうち、ＩｇＧに属するものが好ましい。

また、本発明モノクローナル抗体のうち、ヒトチミジンホスホリラーゼ全体を抗原として得られたモノクローナル抗体よりも、ヒトチミジンホスホリラーゼの一部であって配列番号１又は２のアミノ酸配列を含むペプチド又はそのキャリアタンパクとの結合物を抗原として得られたモノクローナル抗体が好ましい。

このヒトチミジンホスホリラーゼ断片を抗原として得られたモノクローナル抗体は、ヒトチミジンホスホリラーゼ全体に対する抗体よりも、外来タンパクとの交差反応性は低くなり、その結果として、このヒトチミジンホスホリラーゼ断片に対する抗体が、癌の診断に使用された場合には、ヒトチミジンホスホリラーゼ全体に対する抗体よりも感度が上昇する。かかるヒトチミジンホスホリラーゼ断片を抗原として得られた抗体は、全ヒトチミジンホスホリラーゼに対して免疫学的に反応性である。

本発明のモノクローナル抗体のＦｖ、Ｆａｂ及びＦ（ａｂ’）２断片は、抗体の結合部位を有し、完全抗体と同様に抗原に対する結合能力があることは、当該分野ではよく知られており、タンパク分解酵素を用いた抗体の断片化により容易に得ることができる。

本発明のモノクローナル抗体を利用した診断薬は測定感度の向上を図る各種の検出法、例えば、ＥＬＩＳＡ法におけるアビジン－ビオチン－ペルオキシダーゼ複合体（ＡＢＣ）法、ストレプトアビジン－ビオチン複合体（ＳＢＣ）法及びペルオキシダーゼ－抗ペルオキシダーゼ（ＰＡＰ）法等と組み合わせることができ、単独又は他の診断薬と組み合わせて使用することが可能である。

本発明によって得られたモノクローナル抗体は、ヒトチミジンホスホリラーゼ及びＰＤ－ＥＣＧＦを特異的に認識するため、チミジンホスホリラーゼ及びＰＤ－ＥＣＧＦの活性亢進を伴う種々の疾患の免疫化学的及び免疫組織学的診断に有用である。これら疾患には、例えば悪性腫瘍とその転移癌、リウマチ性関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児性網膜症、老人性黄斑部変性などがある。また、これらの診断は、体液を用いて行うこともできる。なぜなら細胞の死に伴い本抗原が体

液中に流出するからである。本発明のモノクローナル抗体を利用した診断薬は、測定感度の向上を図る各種の検出法、例えばＥＬＩＳＡ法におけるＡＢＣ法、ＳＢＣ法及びＰＡＰ法と組み合わせることができ、単独又は他の診断薬と組み合わせて使用することが可能である。

また、本発明のモノクローナル抗体は、組織のイメージング、例えば、インジウム－III標識抗体を用いた画像診断にも応用が可能である。

また、例えば、悪性腫瘍に対しては、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，４２，４５７－４６４（１９８２）において報告されているようにリシンやアブリンの活性部分を抗体と結合させたイムノトキシン等により、ターゲティング治療としての応用も可能である。

実施例

以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例１

抗原－ヒトチミジンホスホリラーゼ又はＰＤ－ＥＣＧＦのＮ末端領域及びＣ末端領域とグルタチオントランスフェラーゼ（ＧＳＴ）の結合タンパク質の調製

ＧＳＴとの融合タンパクは、市販されているファルマシア社のＧＳＴ－ジーンフュージョンシステムを用いて作成した。すなわちヒトチミジンホスホリラーゼ又はＰＤ－ＥＣＧＦのＮ末端側７残基目から２５０残基目のポリペプチドとＧＳＴとの融合タンパク及びヒトチミジンホスホリラーゼ又はＰＤ－ＥＣＧＦのＣ末端側３５３残基目から４８３残基目のポリペプチドとＧＳＴとの融合タンパクになるように大腸菌の発現ベクターに組み込んだ。

このプラスミドを大腸菌ＤＨ５αに導入し、１００μｇ／mlのアンピシリンを含んだ２００mlのＬＢ培養液で波長６６０nmの吸光度が０．６になるまで培養した。吸光度が０．６になったところで最終濃度が１mMになるようにイソプロピル－β－Ｄ（－）－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）を加え、更に３時間培養した後、遠心分離して大腸菌のみを回収した。菌体はＳＤＳ－ポリアクリルアミドサンプル緩衝液に溶解し、分取型のＳＤＳ－ポリアクリルアミド電気泳動装置

（日本エイドー社製）で相当するタンパク質を泳動分取し、Ｎ末端側６．４mg、Ｃ末端側５．７mgの抗原を各々得た。

実施例２

抗ヒトチミジンホスホリラーゼ又はＰＤ－ＥＣＧＦモノクローナル抗体産生細胞のクローン化

８週令のＢａｌｂ／ｃマウス雌（日本クレア社製）３匹をまずフロイント完全アジュバンド中で、実施例１で得られたチミジンホスホリラーゼ又はＰＤ－ＥＣＧＦのＮ末端領域及びＣ末端領域とＧＳＴの結合タンパク質を各々初回免疫した後、マウス１匹あたりそれぞれ１００μｇの融合タンパク質を０．４mlの溶液として腹腔内に投与し、１回目の免疫から１４日後にフロイント完全アジュバンドと共に溶解した融合タンパク質を追加免疫し、更に最終免疫として２回目の免疫から１０日後に腹腔内投与により補助免疫し、４日後にマウスの脾臓を取り出し、３mlの増殖培地中に徐々に均一化させ、２００Ｇで遠心分離して脾臓細胞を分離した。

得られた細胞を合わせた後、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を５０％（Ｖ／Ｖ）含むＲＰＭＩ　１６４０培地（ＰＥＧ４００溶液）にゆっくり懸濁し、徐々にＲＰＭＩ　１６４０培地で希釈してＰＥＧ濃度を５％（Ｖ／Ｖ）にし、細胞を遠心分離機で分離し、徐々に増殖培地を分散させ、マイクロタイタープレートのウエルに１ウエル当たり10^6個／０．１mlの細胞を植え、５％二酸化炭素中で３７℃で２分間インキュベートした。

このようにして調製したマウス脾細胞とミエローマ細胞Ｐ３Ｕ１（Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８Ｕ．１）を電気融合装置を使用し、電気融合法で融合した。

細胞融合後１日目に、０．１mlのＨＡＴ培地を加え、その後３日毎に、半分のＨＡＴ培地を新しいＨＡＴ培地と交換したところ、クローンが８日後に現れ、１０日後迄にＩｇＧ産生検査の為、固相－抗体結合テスト（ＥＬＩＳＡ法）で上澄み液をスクリーニングした。

抗体産生陽性群を２４個ウエルのあるプレートに拡げ、細胞密度が高くなった時に２５cm^2の培養フラスコに移し変え、ハイブリドーマをＨＴ培地（アミノプリテンを含まないＨＡＴ培地）で保持し、抗体産生をチェックした。

ＩｇＧ産生クローンから、チミジンホスホリラーゼ又はＰＤ－ＥＣＧＦに対して、Ｎ末端側及びＣ末端側に特異的に反応するクローンを得るためにＥＬＩＳＡ法でスクリーニングを行った。すなわち、９６穴のＥＬＩＳＡ用マイクロタイタープレートに抗原として用いたＧＳＴとの融合ポリペプチドを１０μｇ／mℓ濃度で各ウエルに５０μℓずつ加え、４℃で一晩放置した。次に市販のブロッキング液（大日本製薬社製）を２００μℓずつ加え、室温で２時間放置し、クローン化したハイブリドーマ細胞の培養上清を各々加え３７℃で１時間保温した。

ペルオキシダーゼ標識抗マウスＩｇＧ抗体（オルガノン・テクニカ社製）を最終濃度１．０μｇ／mℓになるように加え、３７℃で１時間保温した後、ＯＰＤＡ／過酸化水素水を１００μℓ加え、室温で２０分間反応させた。反応終了後、２Ｎ硫酸を１００μℓ加えて反応を停止させた後、マイクロタイターリーダーで４９０nm及び５９５nmの吸光度を測定し、その差を計算してスクリーニングを行った。結果を表１及び表２に示す。

表 1

N末端側ペプチドから得られたクローン

クローン番号	吸光度490-595nm ①PD-ECGF/チミジンホスホリラーゼ固相化	②GST-C 末端側ポリペプチド固相化	①／②×100（%）
1D10	0.720	0.990	72.7
1F4	0.700	0.875	80.0
2A4	0.794	0.941	84.4
2A11	0.779	0.936	83.2
2E6	0.747	0.929	80.4
3C9	0.805	0.996	80.8

各クローンと抗原及びＰＤ－ＥＣＧＦ又はチミジンホスホリラーゼとの結合実験

表 2

C末端側ペプチドから得られたクローン

クローン番号	吸光度490-595nm ①PD-ECGF/チミジンホスホリラーゼ固相化	②GST-C 末端側ポリペプチド固相化	①／②×100（%）
1F3	0.539	0.721	74.8
1F9	0.564	0.726	77.7
1H10	0.595	0.812	73.3
2C9	0.635	0.847	75.0
2D9	0.621	0.707	87.8
2H8	0.642	0.734	87.5

その結果、N末端側抗原に対して6個、C末端側抗原に対して6個陽性となった株が得られた。

次に、各々のクローンについてチミジンホスホリラーゼ又はPD－ECGFとの結合性を検討するために、前述のＥＬＩＳＡ法でチミジンホスホリラーゼ又はPD－ECGFの濃度が1μg／mlになるように抗原だけを加えてスクリーニングを行った。

その結果、GSTとN末端側チミジンホスホリラーゼ又はPD－ECGFの融合タンパク質と結合し、且つチミジンホスホリラーゼ又はPD－ECGFとも結合するクローンを選択し、双方に非常によく結合するクローンをそれぞれ得た。（N末端側クローン；2A4，C末端側クローン；2D9）

実施例3

細胞培養による抗チミジンホスホリラーゼ／PD－ECGFモノクローナル抗体の産生

抗チミジンホスホリラーゼ抗体産生ハイブリドーマは、75 cm^2組織培養フラスコを用い10%（V／V）牛胎児血清（FCS）、100mMピルビン酸及び2－メルカプトエタノールを含んだRPMI　1640培地中で継代培養した。

一方、抗体を精製する際には、無血清培地であるPUF－1（ギブコ社製）を用いて培養した。

この中で 8×10^5個／mlまで増殖したバイブリドーマ細胞を、200Gで5分間の遠心分離によって回収した。

得られた培養上清を、PM10限外濾過膜（アミコン社製）を用いて10ml以下になるように濃縮し、0．45μmのメンブレンフィルターで濾過した。

以上のようにして得られた粗画分に等量の結合用緩衝液を加えてよく混合し、あらかじめ結合用緩衝液で平衡化しておいたプロテインAカラムに粗画分を通過させ、IgGをプロテインAに結合させ、結合用緩衝液10mlで洗浄した後、溶出用緩衝液3mlで結合したIgGを溶出させこの画分を回収した。

得られた画分3mlに直ちに1Mトリス塩酸緩衝液（pH9．0）を1ml加え、pHを中性付近に戻した後、一晩生理リン酸緩衝液（PBS）にて透析し、高純度のモノクローナル抗体IgGを得た。

なお、得られた抗チミジンホスホリラーゼ抗体のサブクラスは市販されているマウスモノクローナル抗体イソタイピングキット（アマシャム社製）を用いた酵素免疫測定法により決定した。

クローンのクラス・サブクラスを表３及び表４に示す。

表　３

Ｎ末端モノクローナル抗体産生クローン

クローン番号	サブクラス
１Ｄ１０	ＩｇＧ１
１Ｆ４	ＩｇＧ２ａ
２Ａ４	ＩｇＧ２ｂ
２Ａ１１	ＩｇＧ２ｂ
２Ｅ６	ＩｇＧ１
３Ｃ９	ＩｇＧ２ａ

各クローンのイムノグロブリンサブクラス

表　４

Ｃ末端モノクローナル抗体産生クローン

クローン番号	サブクラス
１Ｆ３	ＩｇＧ２ａ
１Ｆ９	ＩｇＧ１
１Ｈ１０	ＩｇＧ２ｂ
２Ｃ９	ＩｇＧ２ｂ
２Ｄ９	ＩｇＧ２ｂ
２Ｈ８	ＩｇＧ３

実施例４

マウスの腹水を用いた抗チミジンホスホリラーゼ／ＰＤ－ＥＣＧＦモノクローナル抗体の産生

ハイブリドーマ細胞を血清を含まないＲＰＭＩ　１６４０培地で１回洗浄し、1×10^{7}個／mlの割合でＲＰＭＩ　１６４０培地に再懸濁した。

5×10^{6}個のハイブリドーマ細胞をヌードマウスＢａｌｂｃ／ｎｕ－ｎｕの腹腔内に注射し、２週間後にマウスの腹腔内からモノクローナル抗体を採取した。

得られた腹水を、１５００Ｇで１５分間遠心分離した後、０．４５μｍのメンブレンフィルターで濾過した。

以上のようにして得られた粗画分に等量の結合用緩衝液を加えてよく混合し、

あらかじめ結合用緩衝液で平衡化しておいたプロテインAカラムに粗画分を通過させ、ＩｇＧをプロテインAに結合させ、結合用緩衝液１０mℓで洗浄した後、溶出用緩衝液３mℓで結合したＩｇＧを溶出させこの画分を回収した。

得られた画分３mℓに直ちに１Ｍトリス塩酸緩衝液（pH９．０）を１mℓ加え、pHを中性付近に戻した後、一晩ＰＢＳに対して透析し、高純度のモノクローナル抗体ＩｇＧを得た。

なお、得られた抗チミジンホスホリラーゼ抗体のサブクラスは市販されているマウスモノクローナル抗体イソタイピングキット（アマシャム社製）を用いた酵素免疫測定法により決定した。

クローンのクラス・サブクラスは実施例３と同一であった。

実施例５

イムノブロット法によるチミジンホスホリラーゼ／ＰＤ－ＥＣＧＦの検出

細胞、正常組織及び腫瘍組織から調製したタンパク粗抽出液２００μｇを変性条件下でアクリルアミドの濃度が４％－２０％の勾配ゲルを使用したＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した後、市販のＰＶＤＦ膜（ミリポア社製）にタンパク質を電気的に転写した。

スキムミルクで非特異的な吸着をブロッキングした後、０．５μｇ／mℓの濃度で実施例４で精製した抗チミジンホスホリラーゼ／ＰＤ－ＥＣＧＦ抗体（クローン２Ａ４）を加え、室温で１時間放置した後、４℃で一晩放置した。

ペルオキシダーゼで標識化された抗マウスイムノグロブリンは、市販の製品を用い、ペルオキシダーゼの発色には、ＥＣＬのシステム（アマシャム社製）を使用した。結果を図１及び図２に示す。

図１は実施例４で調製したＮ末端側の抗体２Ａ４とＣ末端側の抗体２Ｄ９の染色結果であり、ＧＳＴとＮ末端側ポリペプチド融合タンパク質には２Ａ４が、ＧＳＴとＣ末端側ポリペプチド融合タンパク質には２Ｄ９がそれぞれ特異的に反応し、且つチミジンホスホリラーゼ／ＰＤ－ＥＣＧＦのｃＤＮＡを導入し、過剰発現させたＫＢ細胞には両抗体共に反応し、分子量５５ＫＤに相当する大きさの位置に明らかにバンドが検出された。

図２は２Ａ４を用いたヒト乳癌組織と隣接正常組織の比較結果３例であり、分

子量５５ＫＤに相当する大きさの位置のバンドからわかるように、右側の隣接正常組織と比較して癌組織でのチミジンホスホリラーゼ／ＰＤ－ＥＣＧＦの発現が高くなっていた。

なお、図１中のレーンは次の通りである。

ＧＳＴ－Ｎ；ＧＳＴとヒトチミジンホスホリラーゼのＮ末端ペプチドを結合させたポリペプチド

ＧＳＴ－Ｃ；ＧＳＴとヒトチミジンホスホリラーゼのＣ末端ペプチドを結合させたポリペプチド

ＫＢ；ＫＢ細胞の細胞抽出液

ＫＢ－ＴＰ；ＫＢ細胞にヒトチミジンホスホリラーゼ／ＰＤ－ＥＣＧＦのｃＤＮＡをトランスフェクトした細胞の細胞抽出液

実施例６

チミジンホスホリラーゼ／ＰＤ－ＥＣＧＦのヒト臨床組織切片における免疫組織化学染色

ヒト悪性腫瘍組織及び隣接正常組織を摘出後、直ちに１０％（Ｖ／Ｖ）ホルマリン生理食塩緩衝液で固定し、２４時間室温で放置後、パラフィンで包埋し、３μｍの切片を作成した。

脱パラフィン処理した後、実施例４で精製した精製抗チミジンホスホリラーゼ抗体（クローン２Ａ４）を１μｇ／㎖の濃度で加え、室温で１時間放置した後、４℃で一晩放置した。更に市販されているフナコシＡＢＣ　ｅｌｌｉｔｅキット（ベクター社製）を用いて染色した。結果を図３及び図４に示す。

図３は正常組織の陰性例であり、図４は大腸癌組織で染色した一例である。このように明らかに腫瘍組織の細胞質が陽性に染色されており、パラフィン固定によって抗原性が低くなっても、採取されてから相当の時間が経過しても反応する、非常に使いやすく、臨床応用に適した有用性の高い抗体であることが判明した。

配列表

配列番号：１

配列の長さ：２４４

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

```
Pro Gly Thr Gly Ala Pro Pro Ala Pro Gly Asp Phe Ser Gly Glu Gly
1               5                   10                  15
Ser Gln Gly Leu Pro Asp Pro Ser Pro Glu Pro Lys Gln Leu Pro Glu
            20                  25                  30
Leu Ile Arg Met Lys Arg Asp Gly Gly Arg Leu Ser Glu Ala Asp Ile
        35                  40                  45
Arg Gly Phe Val Ala Ala Val Val Asn Gly Ser Ala Gln Gly Ala Gln
    50                  55                  60
Ile Gly Ala Met Leu Met Ala Ile Arg Leu Arg Gly Met Asp Leu Glu
65                  70                  75                  80
Glu Thr Ser Val Leu Thr Gln Ala Leu Ala Gln Ser Gly Gln Gln Leu
                85                  90                  95
Glu Trp Pro Glu Ala Trp Arg Gln Gln Leu Val Asp Lys His Ser Thr
            100                 105                 110
Gly Gly Val Gly Asp Lys Val Ser Leu Val Leu Ala Pro Ala Leu Ala
        115                 120                 125
Ala Cys Gly Cys Lys Val Pro Met Ile Ser Gly Arg Gly Leu Gly His
    130                 135                 140
Thr Gly Gly Thr Leu Asp Lys Leu Glu Ser Ile Pro Gly Phe Asn Val
145                 150                 155                 160
Ile Gln Ser Pro Glu Gln Met Gln Val Leu Leu Asp Gln Ala Gly Cys
                165                 170                 175
Cys Ile Val Gly Gln Ser Glu Gln Leu Val Pro Ala Asp Gly Ile Leu
            180                 185                 190
Thr Ala Ala Arg Asp Val Thr Ala Thr Val Asp Ser Leu Pro Leu Ile
        195                 200                 205
```

Thr Ala Ser Ile Leu Ser Lys Lys Leu Val Glu Gly Leu Ser Ala Leu
210 215 220
Val Val Asp Val Lys Phe Gly Gly Ala Ala Val Phe Pro Asn Gln Glu
225 230 235 240
Gln Ala Arg Glu

配列番号：2

配列の長さ：１３０

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Asp Pro Gly Leu Ala Arg Ala Leu Cys Ser Gly Ser Pro Ala Glu Arg
1 5 10 15
Arg Gln Leu Leu Pro Arg Ala Arg Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ala Pro
20 25 30
Ala Asp Gly Thr Val Glu Leu Val Arg Ala Leu Pro Leu Ala Leu Val
35 40 45
Leu His Glu Leu Gly Ala Gly Arg Ser Arg Ala Gly Glu Pro Leu Arg
50 55 60
Leu Gly Val Gly Ala Glu Leu Leu Val Asp Val Gly Gln Arg Leu Arg
65 70 75 80
Arg Gly Thr Pro Trp Leu Arg Val His Arg Asp Gly Pro Ala Leu Ser
85 90 95
Gly Pro Gln Ser Arg Ala Leu Gln Glu Ala Leu Val Leu Ser Asp Arg
100 105 110
Ala Pro Phe Ala Ala Pro Ser Pro Phe Ala Glu Leu Val Leu Pro Pro
115 120 125
Gln Gln
130

産業上の利用可能性

本発明のモノクローナル抗体は、チミジンホスホリラーゼ／ＰＤ－ＥＣＧＦを特異的に測定でき、簡便で広く適用可能であって実用的価値のある手段を提供するのでヒトチミジンホスホリラーゼ及びＰＤ－ＥＣＧＦの活性が亢進している種々の疾患の診断に有用である。

請　求　の　範　囲

１．配列番号１のアミノ酸配列を有するペプチド又はこれを抗原部位として認識されるペプチドに対するモノクローナル抗体。

２．配列番号１のアミノ酸配列を有するペプチドに対するモノクローナル抗体。

３．配列番号２のアミノ酸配列を有するペプチド又はこれを抗原部位として認識されるペプチドに対するモノクローナル抗体。

４．配列番号２のアミノ酸配列を有するペプチドに対するモノクローナル抗体。

５．ヒトのチミジンホスホリラーゼ及びヒト血小板由来血管内皮細胞増殖因子に対して反応する請求項１乃至４に記載のモノクローナル抗体。

６．ＩｇＧに属するものである請求項１乃至４に記載のモノクローナル抗体。

７．請求項１～４記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とするヒトチミジンホスホリラーゼ及び／又はヒト血小板由来血管内皮細胞増殖因子の免疫学的測定法。

８．免疫組織化学染色法である請求項７記載の免疫学的測定法。

図 1

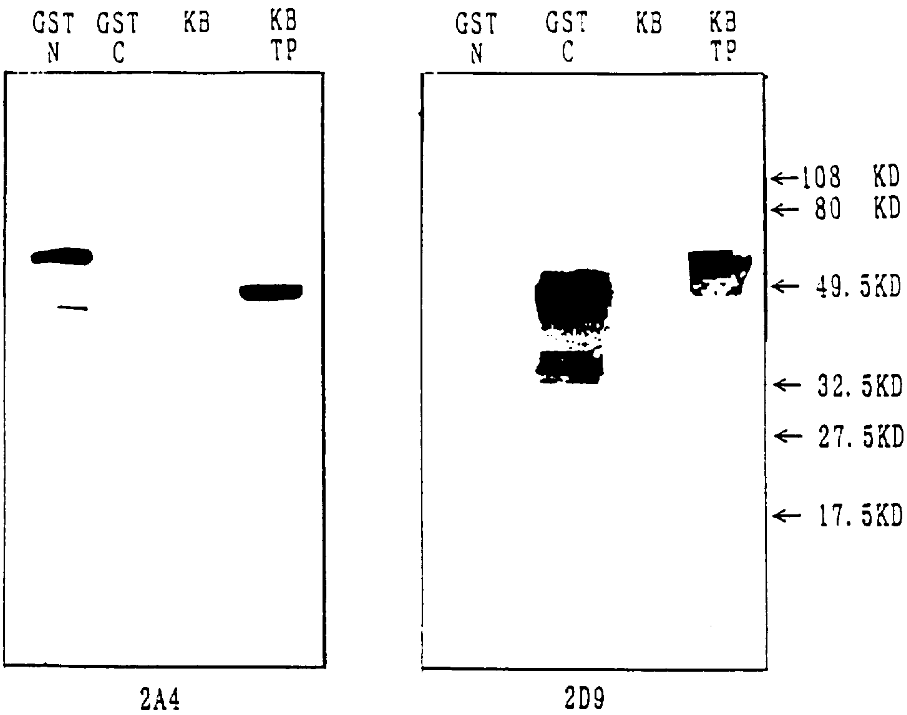
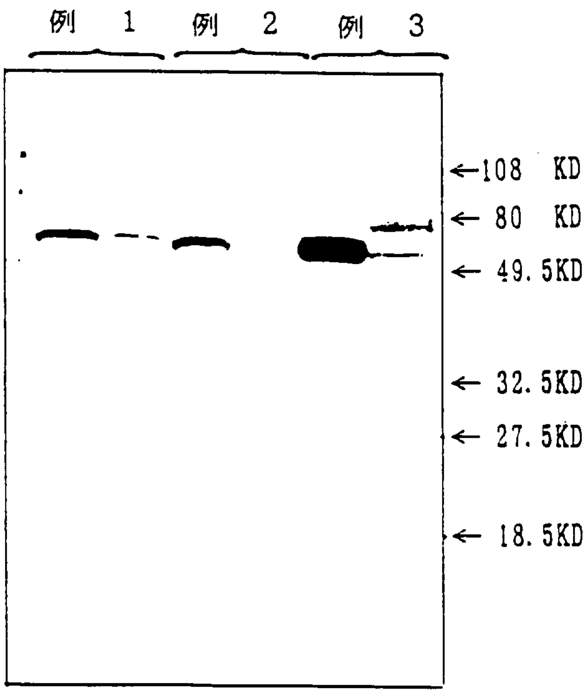

GST N
GST C
KB
KB TP
GST N
GST C
KB
KB TP
←108 KD
← 80 KD
← 49.5KD
← 32.5KD
← 27.5KD
← 17.5KD
2A4
2D9

図 2



2A4

図 3

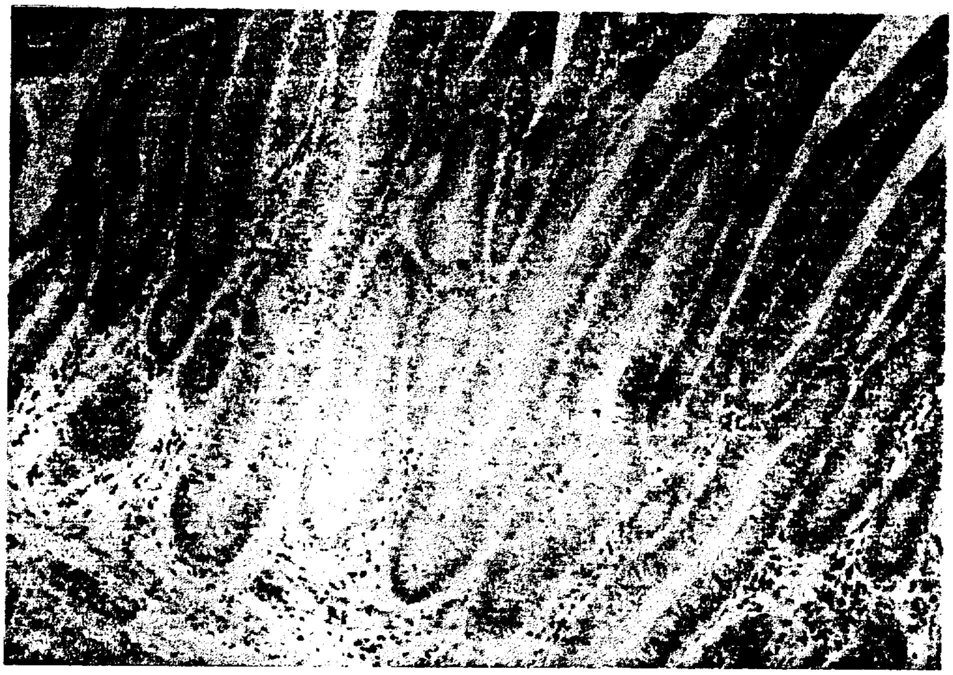
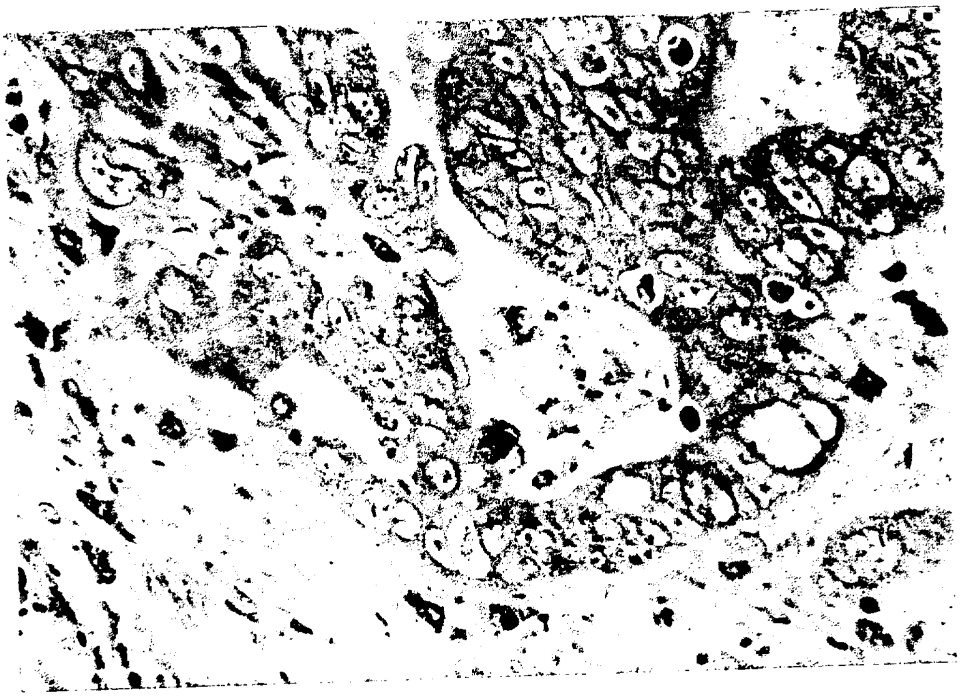


図 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP95/02661

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl^6 C07K16/18, 16/40, C12P21/08, C12N15/06, C12N5/20, G01N33/577//(C12P21/08, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl^6 C12P21/00, 21/02, 21/08, C12N15/02-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS, WPI, WPI/L

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 2-288897, A (Research Corp. Technologies Inc.), November 28, 1990 (28. 11. 90) & EP, 377855, A & US, 5227302, A	1 - 8
Y	Sumizawa, T. et al. "Thymidine phosphorylase activity associated with platelet-derived endothelial cell growth factor", J. Biochem. (1993) Vol. 114, No. 1, p. 9-14	1 - 8
Y	Haraguchi, M. et al. "Sensitivity of human KB cells expressing platelet-derived endothelial cell groqth factor to pyrimidine antimetabolites", Cancer Research (1993) Vol. 53, No. 23, p. 5680-5682	1 - 8
Y	Osamu Kanemitsu "Introduction of Antibody", January 25, 1994 (25. 01. 94), Chijinshokan p. 75-144	1 - 8
A	Furukawa, T. et al. "Angiogenic factor",	1 - 8

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
March 22, 1996 (22. 03. 96)	April 9, 1996 (09. 04. 96)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP95/02661

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Nature (1992) Vol. 356, p. 668	
A	Ishikawa, F. et al. "Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor", Nature (1989) Vol. 338, p. 557-562	1 - 8

国際調査報告	国際出願番号 PCT／JP 95／02661

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl⁶ C07K16/18, 16/40, C12P21/08, C12N15/06, C12N5/20, G01N33/577//(C12P21/08, C12R1:91)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl⁶ C12P21/00, 21/02, 21/08, C12N15/02-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS PREVIEWS, WPI, WPI/L

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	JP, 2-288897, A（リサーチ コーポレーション テクノロジーズ インコーポレーテッド）, 28. 11月. 1990（28. 11. 90）&EP, 377855, A&US, 5227302, A	1－8
Y	Sumizawa, T. et al. "Thymidine phosphorylase activity associated with platelet-derived endothelial cell growth factor", J. Biochem. (1993) 第114巻, 第1号, p.9－14	1－8

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
22. 03. 96	09.04.96

名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）
日本国特許庁（ISA／JP） 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	佐伯裕子 印　4B 9358 電話番号 03－3581－1101 内線 3449

C（続き）．関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	Haraguchi, M. et al. "Sensitivity of human KB cells expressing platelet-derived endothelial cell growth factor to pyrimidine antimetabolites", Cancer Research（１９９３）第５３巻，第２３号，p．５６８０－５６８２	１－８
Y	金光 修，「抗体工学入門」，２５．１月．１９９４（２５．０１．９４），地人書館 p．７５－１４４	１－８
A	Furukawa, T. et al. "Angiogenic factor", Nature（１９９２）第３５６巻，p．６６８	１－８
A	Ishikawa, F. et al. "Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor", Nature（１９８９）第３３８巻，p．５５７－５６２	１－８