

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-506355  
(P2008-506355A)

(43) 公表日 平成20年3月6日(2008.3.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	4B029
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4B063
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4B064
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4B065

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-500356 (P2007-500356)  
 (86) (22) 出願日 平成17年2月16日 (2005.2.16)  
 (85) 翻訳文提出日 平成18年10月25日 (2006.10.25)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IT2005/000078  
 (87) 国際公開番号 WO2005/082938  
 (87) 国際公開日 平成17年9月9日 (2005.9.9)  
 (31) 優先権主張番号 RM2004A000105  
 (32) 優先日 平成16年2月27日 (2004.2.27)  
 (33) 優先権主張国 イタリア (IT)

(71) 出願人 306032202  
 テクノジェン・ソシエタ・ベル・アチオニ  
 TECNOGEN S. p. A.  
 イタリア、イー81013ピアーナ・ディ  
 ・モンテ・ヴェルナ (カゼルタ)、ロカリ  
 ータ・ラ・ファジャネリア  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100106518  
 弁理士 松谷 道子  
 (74) 代理人 100127638  
 弁理士 志賀 美苗  
 (74) 代理人 100138911  
 弁理士 櫻井 陽子

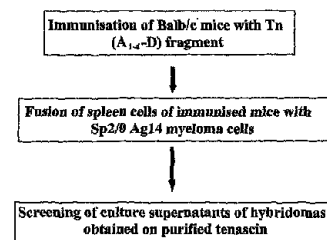
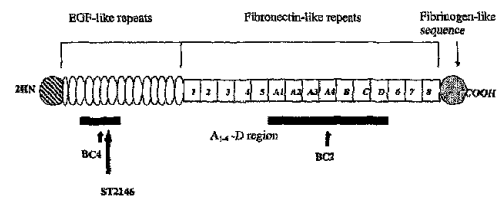
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ヒトテネイシンモノクローナル抗体

(57) 【要約】

軽鎖および重鎖可変領域配列がそれぞれ配列番号1および配列番号2である抗ヒトテネイシンモノクローナル抗体、ヒトテネイシンのA<sub>(1-4)</sub>-D領域内の抗原性エピトープに結合することが出来るそのタンパク分解断片、ヒトテネイシンのA<sub>(1-4)</sub>-D領域内の抗原性エピトープに結合することが出来るその組換え誘導体、その接合体およびその類似機能アナログが記載される。

Schematic representation of human tenascin-C and of the strategy followed for the generation of BC2-like antibodies



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

軽鎖および重鎖可変領域配列がそれぞれ配列番号1および配列番号2である、好ましくはマウスの抗ヒトテネイシンモノクローナル抗体、ヒトテネイシンのA<sub>(1-4)</sub>-D領域内の抗原性エピトープに結合することが出来るそのタンパク分解断片、ヒトテネイシンのA<sub>(1-4)</sub>-D領域内の抗原性エピトープに結合することが出来るその組換え誘導体、その接合体および類似機能アナログ。

## 【請求項2】

さらなるマーカーおよび診断薬を含んでいてもよい請求項1の抗体の断片。

## 【請求項3】

マウス定常領域がそのヒト対応物によって置換されている、請求項1の抗体の組換え誘導体。

## 【請求項4】

マウス定常領域が生物学的に活性の成分によって置換されている、請求項1の抗体の組換え誘導体。

## 【請求項5】

マウス定常領域が医薬上活性な成分によって置換されている、請求項1の抗体の組換え誘導体。

## 【請求項6】

マウス定常領域がアビジンファミリーのメンバーによって置換されている、請求項1の抗体の組換え誘導体。

## 【請求項7】

生物学的に活性な物質と接合している請求項1の抗体の誘導体。

## 【請求項8】

請求項1のビオチン化抗体または請求項2のビオチン化断片または請求項4-7のいずれかのビオチン化誘導体。

## 【請求項9】

請求項1の抗体または請求項2の断片をコードするDNA。

## 【請求項10】

請求項9のDNAを含むベクター。

## 【請求項11】

請求項10のベクターを含む宿主細胞。

## 【請求項12】

配列番号1および配列番号2のヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質またはその断片。

## 【請求項13】

請求項12のタンパク質またはその断片をコードするDNA。

## 【請求項14】

請求項1の抗体の特異的CDR(相補性決定領域)および該CDRを含むタンパク質。

## 【請求項15】

セントロ・ジ・バイオテクノロジー・アバンザーテ、ラルゴ・ロッサナ・ベンジ・10、ジェノア、イタリアに2003年11月12日にブダペスト条約にしたがって受託番号 PD03003として寄託された、請求項1の抗体を産生するハイブリドーマ。

## 【請求項16】

以下の工程を含む請求項1の抗体の調製方法：

- a) 動物をヒトテネイシンのA<sub>(1-4)</sub>-D断片で免疫化する工程；
- b) 該動物の体性脾臓細胞を免疫グロブリンを産生しないミエローマ細胞と融合させる工程；
- c) モノクローナル抗体を選択する工程。

## 【請求項17】

10

20

30

40

50

ビオチン化されていてもよい請求項1の抗体またはそのタンパク分解断片またはその組換え誘導体またはその接合体またはアナログ、またはビオチン化されていてもよい請求項2のその断片、または請求項4-7のいずれかのそのビオチン化誘導体の、テネイシンの発現によって特徴付けられる疾患の治療または診断に有用な医薬製品の調製のための使用。

【請求項18】

該疾患が腫瘍である請求項17の使用。

【請求項19】

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18の使用。

【請求項20】

ビオチン化されていてもよい請求項1の抗体またはそのタンパク分解断片またはその組換え誘導体またはその接合体またはアナログ、またはビオチン化されていてもよい請求項2のその断片、または請求項4-7のいずれかのそのビオチン化誘導体の、固形腫瘍の2段階周術期療法に有用な医薬製品の調製のための使用。

【請求項21】

ビオチン化されていてもよい請求項1の抗体またはそのタンパク分解断片またはその組換え誘導体またはその接合体またはアナログ、またはビオチン化されていてもよい請求項2のその断片、または請求項4-7のいずれかのそのビオチン化誘導体を、少なくとも1つの医薬上許容される媒体および/または賦形剤との混合物として含む、医薬または診断組成物。

【請求項22】

以下の5つのバイアルからなる全身性放射免疫療法、特に三段階プレ標的化放射免疫療法のためのキット:ビオチン化されていてもよい請求項1の抗体またはそのタンパク分解断片またはその組換え誘導体またはその接合体またはアナログ、またはビオチン化されていてもよい請求項2の断片、または請求項4-7のいずれかのビオチン化誘導体を含むバイアル1;アビジンを含むバイアル2;ストレプトアビジンを含むバイアル3;ビオチン化ヒトアルブミンを含むバイアル4;およびビオチン DOTAを含むバイアル5。

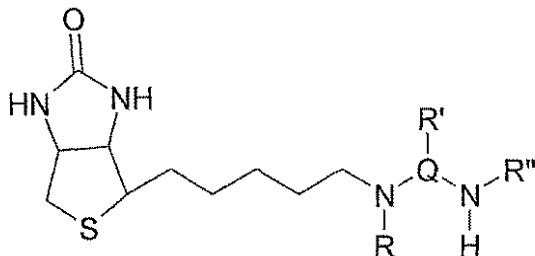
【請求項23】

以下の3つのバイアルからなる局所領域放射免疫療法のためのキット;ビオチン化されていてもよい請求項1の抗体またはそのタンパク分解断片またはその組換え誘導体またはその接合体またはアナログ、またはビオチン化されていてもよい請求項2のその断片、または請求項4-7のいずれかのビオチン化誘導体を含むバイアル1;アビジンを含むバイアル2;およびビオチン DOTAを含むバイアル3。

【請求項24】

それぞれバイアル5またはバイアル3中の該ビオチン DOTAが式(1)の化合物である請求項22または23のキット:

【化1】



(1)

[式中、

Qは、 $-(CH_2)_n-$ 基であり、ここでnは4~12の整数であり、この場合R'は存在しない、または、

Qは、 $-(CH_2)_a-CH(R')_b-(CH_2)_b-$ からなる群から選択され、ここでaおよびbは独立に0

10

20

30

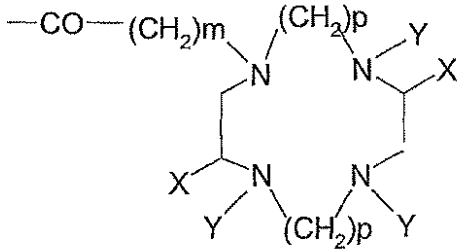
40

50

~nの整数であり、R'は以下に定義する通りである、または、

Qは、シクロヘキシル、フェニル、この場合R'は該シクロヘキシルまたはフェニル環上の置換基である；

Rは、水素または-、ここで、-は式(II)の大環状分子である、  
【化2】



10

(II)

ここで、種々のYは、同一であっても異なっていてもよく、水素、直鎖状または分枝状C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキル、-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-COOHからなる群から選択され、ここでmは、1~3の整数である、

Xは、水素、または基-CH<sub>2</sub>-Uであり、ここで、Uは、メチル、エチル、およびp-アミノフェニルからなる群から選択される、または、

20

Xは、基-(CHW)<sub>o</sub>-Zであり、ここで、oは1~5の整数であり、Wは、水素、メチルまたはエチルであり、Zは、O、N-R<sub>1</sub>およびSから選択される1以上のヘテロ原子を含む5-または6-員複素環基であり、ここで、R<sub>1</sub>は、水素または直鎖状または分枝状C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキルである；または、Zは、-NH<sub>2</sub>、-NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>、または-S-R<sub>2</sub>からなる群から選択され、ここで、R<sub>2</sub>は直鎖状または分枝状C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキルである；

pは、2または3の整数である；

R'は、水素、直鎖状または分枝状C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルキル、-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-Tからなる群から選択され、ここで、Tは、-S-CH<sub>3</sub>、-OH、-COOHからなる群から選択され、そして、qは1または2の整数である；

R''は、R'と同義であるが、その上に以下の条件に従う：Rが-である場合、R''は水素である；Rが水素である場合、R''は-である、あるいは、RおよびR''が、それぞれ、-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-（Rについて）および-（R'について）であり、ここでrは4~12の整数である、ここで、Qは、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-基であり、ここでnは4~12の整数である]。

30

【請求項25】

該バイアル3がアビジンダイマーを含み、ここで、2つのアビジン分子がスベラートにより-NH<sub>2</sub>基を介して結合している、請求項22-24のいずれかのキット。

【請求項26】

該バイアル3がアビジンダイマーを含み、ここで、2つのアビジン分子が分子量3,400のポリエチレングリコールによって-COOH基を介して結合している、請求項22-24のいずれかのキット。

40

【請求項27】

ビオチン化されていてもよい請求項1の抗体またはそのタンパク分解断片またはその組換え誘導体またはその接合体またはアナログ、またはビオチン化されていてもよい請求項2のその断片、または請求項4-7のいずれかのそのビオチン化誘導体が、別の抗テネニン抗体、好ましくは該タンパク質のEGF-様領域を標的化する抗体と組み合わされている、請求項22または23のキット。

【請求項28】

ビオチン化されていてもよい請求項1の抗体またはそのタンパク分解断片またはその組換え誘導体またはその接合体またはアナログ、またはビオチン化されていてもよい請求項2のその断片、または請求項4-7のいずれかのそのビオチン化誘導体が、別の腫瘍特異的抗

50

体と組み合わされている、請求項22または23のキット。

【請求項 29】

ビオチン化されていてもよい請求項1の抗体またはそのタンパク分解断片またはその組換え誘導体またはその接合体またはアナログ、またはビオチン化されていてもよい請求項2のその断片、または請求項4-7のいずれかのそのビオチン化誘導体の、腫瘍免疫局在化方法において有用な組成物の調製のための使用。

【請求項 30】

ビオチン化および/または放射標識されていてもよい請求項1の抗体またはそのタンパク分解断片またはその組換え誘導体またはその接合体またはアナログ、またはビオチン化されていてもよい請求項2のその断片、または請求項4-7のいずれかのそのビオチン化誘導体を含む、注射に好適な、好ましくはバイアルの形態である、容器。

10

【請求項 31】

腫瘍に罹患しているかまたは罹患していることが予測されるヒトに対する、ビオチン化されていてもよい請求項1の抗体またはそのタンパク分解断片またはその組換え誘導体またはその接合体またはアナログ、またはビオチン化されていてもよい請求項2のその断片、または請求項4-7のいずれかのそのビオチン化誘導体の投与、および、該腫瘍の検出を含む、腫瘍イメージング方法。

【請求項 32】

抗体またはそのタンパク分解断片または組換え誘導体または接合体またはアナログが放射標識されている請求項31の方法。

20

【請求項 33】

請求項1の抗体またはそのタンパク分解断片または組換え誘導体または接合体またはアナログ、または請求項2の断片、または請求項4-7のいずれかの誘導体と、第二のテネイン特異的抗体とを含む組合せ。

【請求項 34】

循環テネインレベル、特にA<sub>(1-4)</sub>-D 領域を含むアイソフォームのレベルを測定するための請求項33の組合せの使用であって、該第二の抗体が第二の抗原性エピトープに結合する条件下での、サンドイッチ型インビトロELISAアッセイにおける、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は、抗ヒトテネインモノクローナル抗体、それを得る方法および材料、テネインを発現する腫瘍の診断および治療法における該抗体の使用、および医療分野における使用に好適な該抗体を含む材料に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

腫瘍治療の特異性はしばしば治療の成功の判定における制限因子となっている。実際、多数の抗癌剤による毒作用の発症およびその低い耐容性はその使用および患者の生活の質を制限している。

40

【0003】

毒性の低減は癌細胞のみに対する治療の選択性と直接関連している。モノクローナル抗体は腫瘍に特異的に局在化させる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、活性分子を腫瘍部位に送達する非常に強力な方法を構成する。

【0004】

テネインは、胚形成の際、および癒痕形成および腫瘍発達のプロセスの際の成体組織、ならびに新規に形成された血管において発現する細胞外マトリックス分子である。テネインは正常成体組織には実質的に存在せず、一方、例えば以下のような多くの固形腫瘍の間質において発現する；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., Intl. J. Cancer、

50

54:56-68、1989)、線維肉腫および扁平上皮癌(Ramos、D.M. et al.、*Intl. J. Cancer*、75:680-687、1998)。テネインは神経膠腫において発現するが、対応する正常脳組織には発現しない。テネインの詳細な議論については、WO 92/04464、Wistar および関連引用文献を参照されたい。

【 0 0 0 5 】

EP 0 496 074に基づくと、G. Paganelli et alは、腫瘍の全身性および局所領域治療のための「三段階プレ標的化」と称される方法を開発しており、その結果は以下に報告されている: 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; Grana、C.、et al.、*Br. J. Cancer*、86:207-212、2001。

10

【 0 0 0 6 】

このタイプの癌治療のその他の参考文献はWO 94/04702、およびUS 5578287である。

【 0 0 0 7 】

商標PAGRIT(登録商標)としても知られている三段階プレ標的化治療は、ビオチン化抗-テネインモノクローナル抗体、ストレプトアビジンおよび<sup>90</sup>Y-ビオチンの逐次静脈内投与に基づき、それぞれストレプトアビジンおよび<sup>90</sup>Y-ビオチンに先だってアビジンおよびビオチン化アルブミンを投与して(「追跡」工程)、抗体およびストレプトアビジンの血中濃度を低減させる。三段階プレ標的化方法の選択性は抗-テネインモノクローナル抗体の使用による。細胞表面抗原に向けた標的化と比較して、細胞外マトリックス分子の標的化は、腫瘍細胞自体による抗原発現の調節により影響を受けないという利点をもたらす。プレ標的化治療の用量、投与時間および「追跡」は、最適な腫瘍対非腫瘍の生体内分布比を得るために確立されている。

20

【 0 0 0 8 】

Paganelli (Paganelli、G.、et al.、*Eur. J. Nucl. Med.*、26(4):348-357、1999)による研究に供した、神経膠芽腫(GBM)または未分化星状細胞腫(AA)に罹患している48名の患者において得られた結果は、ストレプトアビジンに対するアレルギー反応の例が多数みられた他は実質的に毒性は無いこと、および治療の予備的有効性を示すものであった。実際、治療の終了の2ヶ月後、25%の患者は腫瘍の低減を示し(完全な応答 = 6%、部分的応答 = 11%、少ない応答 = 8%)、52%の患者は安定に維持され、総応答率は77%であった。平均余命が6ヶ月未満であるかかかる患者の多数において、治療に対する応答は1年を超えて持続した。

30

【 0 0 0 9 】

ビオチン化抗テネイン抗体の役割は、腫瘍への局在化と、ビオチン化分子を介してアビジンおよび次いで<sup>90</sup>Y-ビオチンの蓄積を媒介し、放射性同位元素を直接腫瘍内部に向かわせることである。抗テネイン抗体はすでに以下の特許および特許出願の対象である: US 5,624,659、Duke University; JP 2219590、Rikagaku; WO 92/04464、Wistar;およびWO 03/072608、Sigma-Tau。

【 0 0 1 0 】

1つの特定の抗テネイン抗体が: Siri、A.、et al.、*Nucl. Acid Res.*、19(3):525-531、1991; Balza、E.、et al.、*FEBS* 332:39-43、1993に記載されており;その治療目的での使用が: Riva、P.、et al.、*Acta Oncol.* 38(3): 351-9、1999; Riva、P.、et al.、*Cancer*、80(12): 2733-42; 1997; Riva、P.、et al.、*Int. J. Cancer*、5: 7-13、1992に記載されている。

40

【 0 0 1 1 】

上記研究において該抗体の作成に用いたクローンはBC-2と称される。本出願人は、クローンBC-2は工業的開発には適さないことを示した。というのはクローンBC-2は追加的な(おそらく親ミエローマ株由来の)非機能性軽鎖を産生し、その発現レベルはラージスケールでの産生プロセスの開発の際に増加するため、抗体の工業的規模の精製が妨げられるからである。

50

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0012】

それゆえ医薬用途に要求される純度レベルにて工業的規模にて産生できる抗-テネインモノクローナル抗体の必要性が認識されている。

## 【0013】

Sigma Tau Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.Aが出願人である以前の特許出願 WO 03/072608には、追加的な非機能性軽鎖を生じない抗テネイン抗体ST2146の作成が記載されており、これは非機能性軽鎖が混入している抗体 BC-4と共有される抗原性エピトープを認識することが出来る。

10

## 【課題を解決するための手段】

## 【0014】

本発明の目的である抗体ST2485は、BC-2と部分的に共有されており、それゆえ同じタンパク質領域に位置するエピトープを認識する。この領域は様々な腫瘍組織において高発現している。それゆえ癌診断または標的化に使用される、この領域に特異的な均質なモノクローナル抗体を得ることが重要である。

## 【0015】

さらに、本発明は抗体ST2485は抗体ST2146に加えてテネインに結合する利点を有し、したがって2つの抗体の併用を伴うプレ標的化方法に有用であることを示した。

## 【0016】

20

発明の概要

このたび上記問題を解決する抗ヒトテネインモノクローナル抗体が見いだされた。というのは該抗体は、非機能性軽鎖を有さず、別の抗テネイン抗体と組み合わせる場合に相加性の利点を提供するためである。この抗体はそれを得る方法およびその治療における使用、特にテネインの発現を特徴とする疾患、例えば、腫瘍の治療に有用な産物の調製のための使用と共に本発明の目的である。

## 【0017】

本発明は、さらなる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、該抗体および抗体断片を得る方法、該抗体およびその断片を含む医薬組成物、および、それらを利用する診断および治療方法、ならびに該方法の実施に有用なキットに関する。

30

## 【0018】

本発明はまた、該抗体またはその断片をコードするDNA、かかるDNAを含むベクター、かかるベクターを含む宿主細胞、ヌクレオチド配列、配列番号1および配列番号2によってコードされるタンパク質、該タンパク質および断片をコードするDNA、特異的相補性決定領域(CDR)およびかかるCDRを含むタンパク質にも関する。特に、本発明の目的はまた、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマである。

## 【0019】

本発明の目的である抗体は、それぞれ、図17および18に示される、配列番号1および配列番号2である軽鎖および重鎖の可変領域の配列を特徴とする。簡潔に説明すると、本発明の目的である抗体は名称ST2485によって同定される。また、ST2485の断片またはそのキメラまたは組換え誘導体は、本発明の範囲内において製造および使用することができる。本発明の目的はまた、ヒトテネインのA1-4-D 領域内の抗原性エピトープに結合することが出来る該抗体のタンパク分解断片である。本発明の記載において、抗体断片の意味するところは、ヒトテネイン CのA1-4-D 領域内の抗原性エピトープに結合することが出来る断片である。

40

## 【0020】

本発明によると、該抗体またはタンパク分解断片は好ましくはビオチン化されている。

## 【0021】

本発明のさらなる目的は、抗体ST2485を産生するcST2485と称されるハイブリドーマ細胞株である。

50

## 【 0 0 2 2 】

該ハイブリドーマ細胞株は、セントロ・ジ・バイオテクノロジー・アバンザーテ・ラルゴ・ロッサナ・ベンジ・10・ジェノア・イタリー (Centro di Biotecnologie Avanzate, Largo Rossana Benzi 10, Genoa, Italy) に2003年11月12日にブダペスト条約の規定により、受託番号 PD03003として寄託されている。

## 【 0 0 2 3 】

本発明の目的はまた、ビオチン化されていてもよい抗体ST2485の組換え誘導体である。具体的には、好ましい組換え誘導体としては、マウス定常領域が、そのヒト対応物に置換されているもの(Ferrer, C., et al., J. Biotechnol., 52: 51-60, 1996)、またはマウス定常領域が、生物学的に活性の成分、例えば、アビジンファミリーのメンバー (Penich et ML., Manuel, L., et al., J. Immunol., 163: 44214426, 1999)、腫瘍に向けられた免疫学的エフェクターの刺激に有用な成長因子(例えば、G-CSF、GM-CSF) に置換されているもの、あるいはマウス定常領域が、医薬上活性な成分、例えば、スーパー抗原、毒素、サイトカインまたは抗癌治療効力の増強に有用なあらゆるその他のタンパク質(Di Massim o, AM, et al., British J. Cancer, 75(6):822-828, 1997; Parente D., et al., Anticancer Research, 17(6A):4073-4074, 1997) に置換されているものが挙げられる。かかる誘導体を得る方法は当業者に周知である。

10

## 【 0 0 2 4 】

本発明のさらなる目的は、ビオチン化されていてもよい抗体ST2485の接合化(conjugate d)誘導体である。

20

## 【 0 0 2 5 】

具体的には、好ましい接合化誘導体は、生物学的に活性の成分が常套システムによって抗体に結合しているものである。生物学的に活性の化合物の例としては、アビジンファミリーのメンバー、腫瘍に向けられた免疫学的エフェクターの刺激に有用な成長因子(例えば、G-CSF、GM-CSF)、またはマウス定常領域が、医薬上活性な成分、例えば、スーパー抗原、毒素、サイトカインまたは抗癌治療効力の増強に有用なあらゆるその他のタンパク質、抗癌剤、および放射性同位元素に置換されたものが挙げられる。

## 【 0 0 2 6 】

本発明のさらなる目的は該抗体またはその誘導体の、商標 PAGRIT (登録商標) としても知られている三段階プレ標的化と称される、テネイシンを発現する癌に罹患している対象への好ましくはビオチン化されている抗体ST2485またはそのタンパク分解断片の投与を含む方法によって好ましくは実施される癌放射免疫療法のための方法に有用な医薬製品の調製のための使用である。

30

## 【 0 0 2 7 】

本発明の目的である抗体およびその接合体の組換え誘導体は、癌治療に有利に用いることが出来る。それゆえ、抗体およびその断片または誘導体の、テネイシンを発現する腫瘍の治療用医薬の調製における使用は、本発明のさらなる目的を構成する。

## 【 0 0 2 8 】

放射免疫療法の実施のために、一方は全身用であり他方は局所用である2つの治療用キットが記載される。これらのキットは商標 PAGRIT (登録商標) によっても知られている。全身用キットは以下を含む5つのバイアルからなる：本発明によるビオチン化抗体またはその断片または誘導体を含むバイアル1;アビジンを含むバイアル2;ストレプトアビジンを含むバイアル3;ビオチン化ヒトアルブミンを含むバイアル4;およびビオチンDOTA (即ち WO 02/066075に記載のビオチン誘導体)を含むバイアル5。局所用キットは全身用キットのバイアル1、2および5に対応する3つのバイアルからなる。バイアルは治療すべき対象、好ましくはヒト対象における注射に好適なように調製される。放射免疫療法の実施のために、本発明の目的である試薬を単独でまたはPAGRIT (登録商標) キットのその他の成分と組み合わせて用いた、腫瘍の外科的除去を経ている患者の手術中治療に基づくIART (Intraoperative Avidination for Radionuclide Treatment) と称される方法が記載される。

40

## 【 0 0 2 9 】

50

特定の容器、好ましくは、抗体またはその断片をビオチン化形態にて含む注射に最適なバイアルの形態の容器は本発明のさらなる目的を構成する。

【0030】

本発明の1つの態様によると、治療用キットにおいて、ビオチン化抗体はその他の抗テネイシン抗体、好ましくは該タンパク質のEGF-様領域に対する抗体と組み合わせられる。あるいは、ビオチン化抗体は腫瘍に特異的なその他の抗体と結合させてもよい。このタイプの方法の一般的説明は、EP 0 496 074、European Journal of Nuclear Medicine Vol.26、No4; April、1999;348-357、US 5,968,405に記載されている。

【0031】

本発明のさらなる目的は、腫瘍におけるインビボ免疫局在決定による後で行う診断目的(「イメージング」)のために画像を取得するためのモノクローナル抗体ST2485の使用である。

10

【0032】

本発明のさらなる目的は、テネイシンの血中濃度を測定するための診断キットの生産のための試験において第二の抗テネイシン抗体と組み合わせられたモノクローナル抗体ST2485の使用である。

【0033】

これらおよびその他の本発明の目的は、実施例および図面も参照して以下に詳細に説明する。

【0034】

20

#### 図面の簡単な説明

図1: ヒトテネイシン C およびBC-2-様抗体の作成に用いた戦略の略図。

【0035】

図2: 還元および非還元条件下における抗体ST2485のSDS-PAGE (a、b) およびウェスタンブロット(c、d) 分析。還元条件下において、抗体の軽鎖のレベルにてダブルバンドが観察される(b、d)。

【0036】

図3: 酵素 PNGaseF (Flavobacterium由来ペプチド-N-グリコシダーゼ)での消化による脱グリコシル化に供された抗体ST 2485のSDS-PAGE 分析: 高分子量軽鎖バンドの消失が観察される。

30

【0037】

図4: 抗体ST2485およびBC-2のヒドロキシアパタイトクロマトグラフィープロファイル。

【0038】

図5: ウェスタンブロット分析によるヒトテネイシンおよびTn (A<sub>(1-4)</sub>-D) 断片に対するST 2485の結合特異性。

【0039】

図6: テネイシン C (a) またはTn (A<sub>(1-4)</sub>-D) 断片 (b) に対する結合についてのST2485とBC-2との間の競合ELISA。

【0040】

図7: テネイシン C (a) およびTn (A<sub>(1-4)</sub>-D) 断片 (b) に対するBC-2と比較したST2485の免疫反応性。

40

【0041】

図8: テネイシン C (a) およびTn (A<sub>(1-4)</sub>-D) 断片 (b) に対するビオチン化 ST2485およびBC-2の免疫反応性。

【0042】

図9: LMM3 腫瘍 (マウス乳癌) および正常マウス腸において発現するマウステネイシンの抗体ST2485の交差反応性。

【0043】

図10: ヌードマウスにおけるST2485 生体内分布研究に採用したプロトコール。

【0044】

50

図11および11a: BC-2と比較した様々な投与用量でのST2485の生体内分布。投与したすべての用量において、腫瘍におけるST2485の蓄積は少なくともBC-2の2倍である。

【0045】

図12および12a: BC-2と比較したST2485の腫瘍対非腫瘍比。これらの比は投与したすべての用量において抗体ST2485の方が高い。

【0046】

図13: ELISA試験による抗テネイシン抗体ST2485およびST2146のインビトロ干渉 (a)および相加性試験 (b)。

【0047】

図14および14a: BiaCore 分析による抗体ST2485およびST2146のインビトロ相加性試験。

10

【0048】

図15: 抗体ST2485およびST2146のインビボ相加性研究に採用したスキーム。

【0049】

図16: 腫瘍1g当たりに局在している抗体のngにて表した、抗体ST2485およびST2146のインビボ相加性。

【0050】

図17: 配列番号1、ST2485軽鎖可変領域(VL)の配列。コードされるアミノ酸配列は配列番号3に示す。

【0051】

図18: 配列番号2、ST2485重鎖可変領域(VH)の配列。コードされるアミノ酸配列は配列番号4に示す。

20

【0052】

#### 発明の詳細な説明

本発明者らは、ハイブリドーマ細胞株 cST2485から産生されるST2485と称される新規抗ヒトテネイシン抗体を調製し、その軽鎖および重鎖可変領域配列はそれぞれ配列番号1および配列番号2である。該抗体はヒトテネイシンのA<sub>(1-4)</sub>-D領域内の抗原性エピトープに結合することが出来る。

【0053】

本発明による抗体のタンパク分解断片はヒトテネイシンのA<sub>(1-4)</sub>-D領域内の抗原性エピトープに結合することが出来る。

30

【0054】

本発明による抗体の組換え誘導体は、当業者に周知の常套方法にしたがって得られる。好ましい組換え誘導体は、マウス定常領域が、そのヒト対応物、または生物学的にまたは医薬上活性な成分、またはアビジンファミリーのメンバーによって置換されているものである。

【0055】

本発明によると、接合化誘導体は当該技術分野において周知の常套方法により得られる。好ましい接合化誘導体は生物学的に活性な部分が抗体に結合しているものである。生物学的に活性な部分の例としては、アビジンファミリーのメンバー、腫瘍に向けられた免疫学的エフェクターの刺激に有用な成長因子(例えば、G-CSF、GM-CSF)、薬理的に活性な部分、例えば、毒素、スーパー抗原、サイトカインまたは治療上の抗癌作用の増強に有用なその他のあらゆるタンパク質、抗癌剤、および放射性同位元素が挙げられる。

40

【0056】

組換えおよび接合化誘導体の調製に関するさらなる情報については、WO 03/072608を参照されたい。

【0057】

本発明によると、モノクローナル抗体の組換えまたは接合化誘導体はまた、「誘導体」とも称される。

【0058】

本発明の1つの好ましい態様において、抗体、その断片および誘導体はビオチン化され

50

ていてもよい。

【0059】

本発明による抗体、その断片および誘導体はまた、有利なことにさらなるマーカーおよび診断薬を含んでいてもよい。

【0060】

本発明はまた、上記のモノクローナル抗体またはその断片をコードするDNAも含む。本発明はまた、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。

【0061】

ベクターおよび宿主細胞はこの分野に属する周知の事実の範囲内である。

【0062】

本発明はまた、ヌクレオチド配列、配列番号1および配列番号2によってコードされるタンパク質またはその断片、およびそれをコードするDNAも含む。

【0063】

本発明はまた、上記抗体の特異的CDR(相補性決定領域)および該CDRを含むタンパク質も含む。

【0064】

本発明による抗体を調製する方法は、以下の段階からなる：

- a) 動物、好ましくはマウスの、ヒトテネインのA<sub>(1-4)</sub>-D断片による免疫化；
- b) 該動物の体性脾臓細胞と免疫グロブリンを産生しないミエローム細胞との融合；
- c) モノクローナル抗体の選択。

【0065】

モノクローナル抗体ST2485は上記のハイブリドーマ細胞株 cST2485により産生される。

【0066】

本発明によると、ビオチン化されていてもよい、抗体またはその断片またはその誘導体は、テネインの発現を特徴とする疾患の治療および診断に有用な医薬製品の調製に用いられる。具体的には、該疾患は腫瘍であり、より具体的には、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。

【0067】

一つの好ましい側面において、上記医薬製品は国際特許出願WO 03/07268に記載の固形腫瘍の2段階周術期療法において用いられる。このタイプの療法において、ビオチン化抗体、次いでアビジンが投与され、実際の次に投与する抗癌剤のための「人工受容体」を構築する。この場合、抗癌剤はビオチンによって送達され、ビオチンは抗癌剤との複合体を形成するのに好適な、以下ビオチン化合物と称する化合物中に含まれ、術後期に全身投与される。ビオチンは、実際、アビジンが存在する場所にのみ局在し、この場合には、それは手術の間に数時間(例えば、4~72時間)早く外科医によって導入されているために、治療についての興味がある領域にアビジンが存在することを確信することが出来る。これは、原発腫瘍の除去とアジュバント療法との経過時間を劇的に短縮する点で有利である。

【0068】

本発明の工業的側面に関して、本明細書に記載される抗体は、医薬分野における慣行にしたがって、医薬組成物または治療または診断キットに好適に製剤される。

【0069】

医薬組成物およびキットは、全く当該技術分野において常套のタイプのものであり、周知の事実に基づくのみで当業者によって調製できる。医薬組成物の例は、本発明において引用されている文献において提供されている。キットについても同様である。特に好ましいのは、Paganelli et alによる、そしてEP 0 496 074、WO 02/066075、WO 03/072608、およびWO 03/075960における上記研究において記載されている腫瘍放射免疫療法用のキットである。放射免疫療法キットの特定の使用は、WO 03/069632に記載の装置によって実行することができる。

【0070】

少なくとも1つの医薬上許容される賦形剤または媒体との混合物中に、ビオチン化され

10

20

30

40

50

ていてもよい抗体またはその誘導体または断片を含む医薬組成物も本発明の範囲に含まれる。

【0071】

本発明の特定の態様において、キットは全身性放射免疫療法、特に三段階プレ標的化放射免疫療法のために提供され、5つのバイアルを含み、バイアル1はビオチン化されているもよい抗体またはその断片または組換え誘導体またはその接合体またはアナログを含み；バイアル2はアビジンを含み；バイアル3はストレプトアビジンを含み；バイアル4はビオチン化ヒトアルブミンを含み；そしてバイアル5はビオチン DOTAを含む。

【0072】

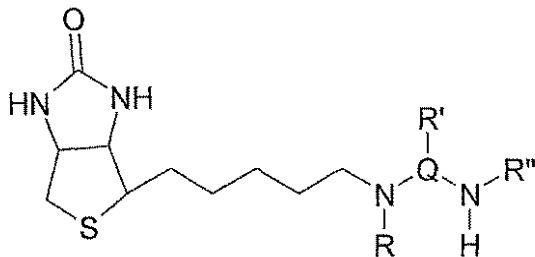
本発明の別の態様において、キットは局所領域放射免疫療法のためのものであり、全身用キットのバイアル1、2および5と同じである3つのバイアルを含む。

10

【0073】

特に好ましい態様において、ビオチン DOTAを含むバイアルにおける、該ビオチン DOTAは式(1)の化合物である。

【化1】



20

(1)

[式中、

Qは、 $-(CH_2)_n-$ 基、ここで、 $n$ は4~12の整数であり、この場合、 $R'$ は存在しない、または、

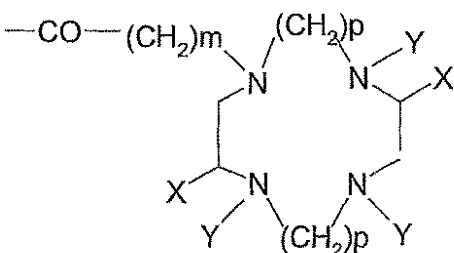
Qは、 $-(CH_2)_a-CH(R')_b-(CH_2)_b-$ からなる群から選択され、ここで、 $a$ および $b$ は独立に0~ $n$ の整数であり、 $R'$ は以下に定義する通りである、または、

Qは、シクロヘキシル、フェニルであり、この場合、 $R'$ はシクロヘキシルまたはフェニル環上の置換基である；

30

Rは、水素または-、ここで-は式(11)の大環状分子、

【化2】



40

(11)

ここで、様々な $Y$ は、同一であっても異なってもよく、水素、直鎖状または分枝状 $C_1$ - $C_4$ アルキル、 $-(CH_2)_m-COOH$ からなる群から選択され、ここで $m$ は1~3の整数である、

$X$ は、水素、または基 $-CH_2-U$ 、ここで $U$ は、メチル、エチル、および $p$ -アミノフェニルからなる群から選択され、または、

$X$ は、基 $-(CHW)_o-Z$ であり、ここで $o$ は1~5の整数であり、 $W$ は、水素、メチルまたはエチル、 $Z$ は、 $O$ 、 $N-R_1$ および $S$ から選択される1以上のヘテロ原子を含む5-または6-員複素環

50

基であり、ここで、 $R_1$ は水素または直鎖状または分枝状 $C_1-C_4$  アルキルである；またはZは、 $-NH_2$ 、 $-NH-C(=NH)-NH_2$ 、または $-S-R_2$ からなる群から選択され、ここで $R_2$ は直鎖状または分枝状 $C_1-C_4$  アルキルである；

$p$ は2または3の整数である；

$R'$ は、水素、直鎖状または分枝状 $C_1-C_4$  アルキル、 $-(CH_2)_q-T$ からなる群から選択され、ここで、 $T$ は、 $-S-CH_3$ 、 $-OH$ 、 $-COOH$ からなる群から選択され、そして、 $q$ は1または2の整数である；

$R''$ は $R'$ と同義であるが、その上に以下の条件に従う： $R$ が- の場合、 $R''$ は水素である； $R$ が水素の場合、 $R''$ は- である、あるいは $R$ および $R''$ は、それぞれ、( $R$ について) $-(CH_2)_r-$  および( $R''$ について) $-$  であり、ここで $r$ は4~12の整数である、ここで、 $Q$ は、 $-(CH_2)_n-$  基であり、ここで $n$ は4~12の整数である ]。

10

【0074】

これらの化合物はWO 02/066075に記載されている。

【0075】

特に好ましい態様において、アビジンを含むバイアルにおいて、アビジンは2分子のアビジンがスプラートにより $-NH_2$  基を介して結合しているアビジンダイマーであるか、または、2分子のアビジンがWO 03/075960に記載のように分子量3,400のポリエチレングリコールにより $-COOH$ 基を介して結合しているアビジンダイマーである。

【0076】

本発明によるキットにおいて、ビオチン化されていてもよい抗体、そのタンパク分解断片、その誘導体は、好ましくはタンパク質のEGF-様領域を標的化するその他の抗テネイン抗体との組合せにおいて存在してもよいし、その他の腫瘍特異的抗体との組合せにおいて存在してもよい。

20

【0077】

本発明のすべての側面は、テネインを発現する腫瘍の療法への適用に加えて、腫瘍の診断、特に腫瘍免疫局在化方法、例えば、イメージングにも適用される。

【0078】

本発明のさらなる目的は、好ましくは注射に好適なバイアルの形態であって、ビオチン化および/または放射標識されていてもよい、抗体またはそのタンパク分解断片またはその誘導体を含む容器である。

30

【0079】

本発明の別の側面において、抗体またはその断片、組換え誘導体、またはアナログは、循環テネインレベル、特に $A_{(1-4)}$ -D 領域を含むアイソフォームのレベルを測定する目的で、第二の抗体がテネインの第二の抗原性エピトープに結合する条件下で、サンドイッチ型インビトロ ELISAアッセイにおいて、第二のテネイン特異的抗体と組み合わせて用いられる。

【0080】

以下の実施例により本発明をさらに説明する。

#### 実施例 1

BC-2 特異性を有するが非機能性軽鎖を産生しない新規ハイブリドーマを作成する目的で、Balb/cマウスを、BC-2によって認識されるエピトープを含むヒトテネインの $A_{(1-4)}$ -D 断片で免疫した(Siri, A., et al., Nucl. Acid Res., 19(3):525-531, 1991; Balza, E., et al., FEBS, 332:39-43, 1993)。ヒトテネインCおよびBC-2-様抗体の作成に用いた戦略の略図を図1に示す。標準的方法にしたがって、Tn ( $A_{(1-4)}$ -D) 断片で免疫したマウスの脾臓細胞を、免疫グロブリンを産生しないミエローマ細胞Sp2/0-Ag14と融合し(Cianfriglia, M., et al., Methods Enzymol., 121:193-210, 1986)、得られたハイブリドーマ集団をSK-Mel 28 ヒトメラノーマ細胞(ICLC HTL99010)からの精製テネインに対するELISA試験によるスクリーニングに供した。抗テネイン抗体を分泌するハイブリドーマをFCSを含有する増殖培地における限界希釈によって2回、そして動物起源のタンパク質非含有培地(Animal Derived Component Free Medium HyClone, HyQR Perbio)において

40

50

2回クローニングした。

【0081】

ST2485標準物質の産生は、2-リットルのバイオリアクター中でcST2485ハイブリドーマ細胞を培養することにより達成した；cST2485 Post Production Cell Bank (PPCB)の2回連続の限界希釈サブクローニングにより、サブクローン cST2485/A3e/A12fが選択され、Master Cell Bank (MCB)およびWorking Cell Bank (WCB)の生成に用いた。

【0082】

ST2485はIgG1/k アイソタイプのマウス免疫グロブリンである。

【0083】

図2は還元および非還元条件での抗体ST2485のSDS-PAGE (a、b)およびウェスタンブロット(c、d)分析を示す。還元条件(b、d)において、抗体の軽鎖のレベルにダブルバンドが観察される；ウェスタンブロット分析はこの2本のバンドが免疫グロブリンの軽鎖として免疫反応性であることを示す。図3に示す、抗体ST2485のヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー分析は、わずかに非対称的なピークにより抗体が軽度不均質であることを確認する。一方、同じ分析において、抗体BC-2は顕著に不均質なプロファイルを示し、ここで3本のピークが識別可能であり、そのなかでピーク1のみが完全に機能的な均質な抗体に対応する。

【0084】

抗体ST 2485の不均質性を規定するために、抗体ST 2485のサンプルを酵素 PNGaseF (フラボバクテリウム属由来ペプチド-N-グリコシダーゼ)によるN-グリコシド残基の消化に供した。酵素消化は製造業者に指示された条件でProzyme 脱グリコシル化キット (カタログ番号GE51001)を用いて行った：およそ 8 μgのST2485および5 mUの酵素を一晩37 °Cで10 μlの反応混合物中で反応させた。消化済または未消化の抗体ST2485を還元条件で12% ポリアクリルアミドゲルで泳動した。ゲルをクーマシーブリリアントブルーで染色した。

【0085】

図4に示す還元条件でのSDS-PAGE 分析によって示されるように、消化により高分子量軽鎖バンドが消失した。この知見は抗体ST2485の2本の軽鎖バンドはそのグリコシル化(高分子量)および非グリコシル化(低分子量)バリエーションに対応することを示す。潜在的 N-グリコシル化部位の存在は、免疫グロブリンcDNA配列データによっても確認された(図17)。

【0086】

カッパ軽鎖の可変領域をM. Sassano et al. Nucl. Ac. Res. (1994) 22, 1768-1769に記載のように、抗体の定常領域を認識する以下のプライマー対を用いて環状 cDNAから増幅した(5' GGAAGATGGATACA-GTTGGTG (配列番号5)、5' CAAGAGCTTCAACAGGAATGAG (配列番号6))。

【0087】

図5に示すウェスタンブロット分析により示されるように、テネイシンA<sub>(1-4)</sub>-D 領域に対するST2485の結合は特異的である。該抗体はヒトテネイシンおよびA<sub>(1-4)</sub>-D 断片に結合したが、BC-4 抗体によって認識されるエピトープを含む同タンパク質のEGF様断片には結合しなかった。

【0088】

図6に示す2つの抗体、抗体ST2485およびBC-2抗体の間の競合ELISAアッセイによって示されるように、ST2485はヒトテネイシンに、特有のエピトープにおいて、または、BC-2と部分的に共有されたエピトープにおいて結合する。ビオチン化抗体BC-2を予備的実験にて確立された濃度にて、漸増濃度の非ビオチン化 BC-2 (曲線1)またはST2485 (曲線2)とともに、抗原テネイシンC (a)またはTn A<sub>(1-4)</sub>-D 断片(b)で感作されたプレート上に分注した。ビオチン化抗体の結合はHRP-ストレプトアビジンおよび関連する発色基質TMBの添加の後に測定する。抗体ST2485は、BC-2のテネイシンC またはTn A<sub>(1-4)</sub>-D 断片への結合の40%の阻害をもたらした。

【0089】

10

20

30

40

50

図7に示すように、ST2485の免疫反応性をテネイシンCおよびTn A<sub>(1-4)</sub>-D断片に対するELISAアッセイによってBC-2との比較において評価した。抗体ST2485およびBC-2および正常マウス免疫グロブリン(nMIgG)を漸増濃度にてテネイシンC(a)またはTn A<sub>(1-4)</sub>-D断片(b)で感作されたプレート上に分注した;アルカリホスファターゼで標識した二次抗マウス抗体および関連発色基質(pNPP)の添加により抗体の用量応答曲線を決定することが出来た。OD 1.0を得るために必要なST2485の量は、全テネイシン(a)に対するBC-2の量のおよそ13分の1であり、Tn (A1-4-D)断片(b)に対するBC-2の量のおよそ10分の1である。

#### 【0090】

BIAcore 分析によってテネイシンCおよびTn (A<sub>1-4</sub>-D)断片の両方に対する抗体ST2485の親和性を評価した。テネイシンCに対するST2485のKD<sub>1</sub>は $9.77 \times 10^{-10}$  M ( $k_{a1} = 6.02 \times 10^5$ ;  $k_{d1} = 5.88 \times 10^{-4}$ )であり、BC-2のKD<sub>1</sub>は $2.54 \times 10^{-7}$  M ( $k_{a1} = 9.85 \times 10^3$ ;  $k_{d1} = 2.5 \times 10^{-3}$ )である。Tn (A<sub>1-4</sub>-D)断片に対するST2485のKD<sub>1</sub>は $9.72 \times 10^{-10}$  M ( $k_{a1} = 3.28 \times 10^5$ ;  $k_{d1} = 3.19 \times 10^{-4}$ )であり、BC-2のKD<sub>1</sub>は $7.39 \times 10^{-8}$  M ( $k_{a1} = 2.68 \times 10^4$ ;  $k_{d1} = 1.93 \times 10^{-3}$ )である。

10

#### 【0091】

ビオチン化の後の免疫反応性の維持はプレ標的化において使用される抗体の基本的な要求条件であるため、ビオチン化 ST2485 (8.3 ビオチン/分子)の挙動をビオチン化BC-2 (7.6 ビオチン/分子)と比較してELISAおよびBIAcore アッセイによって評価した。図8に関して、ビオチン化および非ビオチン化抗体ST2485およびBC-2ならびに正常マウス免疫グロブリン(nMIgG)を漸増濃度にてテネイシンC (a)またはTn A<sub>(1-4)</sub>-D断片 (b)で感作されたプレート上に分注した;アルカリホスファターゼで標識した二次抗-マウス抗体および関連発色基質 (pNPP)の添加により、非ビオチン化抗体と比較しての各ビオチン化抗体の用量応答曲線の判定(残余の免疫反応性)が可能となった。テネイシンCに対するビオチン化 ST2485およびBC-2の残余の免疫反応性はそれぞれ76%および88%であった。Tn A<sub>(1-4)</sub>-D断片に対する、ST2485およびBC-2の残余の免疫反応性はそれぞれ73%および83%であった。

20

#### 【0092】

テネイシン全体に対するビオチン化抗体のBIAcore 分析は、ビオチン化 ST2485について、KD<sub>1</sub> 親和性 =  $2.88 \times 10^{-9}$  M ( $k_{a1} = 2.8 \times 10^5$ ;  $k_{d1} = 8.07 \times 10^{-4}$ )およびビオチン化 BC-2について、KD<sub>1</sub> 親和性 =  $3.71 \times 10^{-7}$  M ( $k_{a1} = 6.0 \times 10^3$ ;  $k_{d1} = 2.23 \times 10^{-3}$ )を示した。したがってビオチン化 ST2485は良好な免疫反応性および親和性特徴を維持しており、ビオチン化 BC-2と比較しておよそ100倍のテネイシンに対する親和性を保持していた。

30

#### 【0093】

様々なヒト腫瘍(乳房、肺、胃、大腸)に対する免疫組織化学研究によって、ST2485の局在が細胞外マトリックスのレベルであることが示され、BC-2についての報告と類似していた(Natali, PG, et al., Int. J. Cancer, 47: 811-16, 1991)。これらの研究はまた、図9において見られるように、正常マウス組織において発現しているものを含むマウステネイシンとの交差反応性を、ST2485が有する能力を示した。ホルマリン中に固定されたLMM3腫瘍(マウス乳癌)および正常マウス腸の切片を10 μg/mlのST2485または正常マウス IgG1抗体(対照)とともにインキュベートした。ビオチン化二次抗-マウス抗体およびアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体(Vectastain Elite ABCキット)とのインキュベーションの後、テネイシンとの結合が、発色基質DAB(Vector)の添加により検出された。対照はMayerのヘマトキシリンを用いて行った。LMM3およびマウス腸切片はST2485について陽性であるが、対照抗体については陽性ではない。抗体BC-2はパラフィン包埋された固定組織切片を認識することができないため、BC-2と比較してのこれらの研究は行うことが出来なかった。正常組織により発現しているものを含む、マウステネイシンを認識するST2485の能力により、以下に記載するマウスモデルにおける抗体生体内分布研究において得られた結果の重要性が大きなものとなる。

40

#### 【0094】

抗体が腫瘍に局在する能力を評価するために、ビオチン化 <sup>125</sup>I-標識化ST2485およびBC

50

-2の生体内分布研究を行った。これらの研究は図10に模式的に示す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おいて行った。

【0095】

動物の皮下に0.1 mlの滅菌塩類溶液中の $4 \times 10^6$ のヒト大腸癌HT-29細胞を接種した。15日後、腫瘍の大きさがおよそ200 mgに達すると、5匹の動物の群に $^{125}\text{I}$ -BC2、 $^{125}\text{I}$ -ST2485、または正常マウス $^{125}\text{I}$ -免疫グロブリン(nMlg)を静脈内投与し、これら抗体はいずれもビオチン化されており(7-9 ビオチン/mol)、5種類の用量で投与した:100  $\mu\text{l}$ の滅菌PBS中0.2-0.5-1-2-5  $\mu\text{g}$ /マウス。抗体の投与の5日後、動物を屠殺し、血液、脾臓、腎臓、肝臓および腫瘍のサンプルを採取して、放射能の存在について調べた。屠殺の24時間前に動物に、100  $\mu\text{l}$ の滅菌PBS中のアビジンを、抗体の100倍の用量にて静脈内投与した(追跡)。

10

【0096】

図11および11aに示す結果は、BC-2およびST2485はともに、用量にかかわらず腫瘍に特異的に局在することを示す(抗体の量は組織1グラム当たり注入した用量のパーセンテージとして表す:%ID/gr)。さらに、アッセイしたすべての用量においてST2485はBC-2と比較して腫瘍により多く局在化しており、常により高い腫瘍対非腫瘍比を維持していた(図12および12a)。特に、1  $\mu\text{g}$ /マウスの用量での腫瘍におけるST2485の蓄積は注入用量の16%であり、一方BC-2の蓄積はアッセイしたいずれの用量においても5%を上回ることはなかった。1  $\mu\text{g}$ /マウスの用量において、ST2485についての腫瘍:血液比は20(至適用量)を超え、一方抗体BC-2についてはこの比はアッセイしたいずれの用量においても6を上回ること

20

【0097】

ST2416はタンパク質のEGF-様領域に局在するエピトープに対して作成されたものである(De Santis, R., et al., Br. J. Cancer, 88: 996-1003, 2003, WO 03/072608)、PATENT (登録商標)およびIART法における抗テネイシン抗体ST2485およびST2146の併用の可能性を評価するために、インビトロおよびインビボ相加性実験をこれら2つの抗体について行った。図13は、テネイシンCで感作されたプレートにて行われた2つのELISA試験において、抗体ST2485およびST2146の間でエピトープ干渉が無いこと(13a)およびそれらの抗原に対する結合の相加性がみられること(13b)を示す。干渉を評価するために、(a)様々な濃度のビオチン化抗体ST2485を、飽和濃度のST2146の非存在下(1)および存在下(2)においてテネイシンCで感作されたマイクロプレートに分配した:重ね合わさった曲線1および2は、2つの抗体の間でエピトープ干渉の非存在を示す。というのは、ビオチン化ST2485のテネイシンに対する結合は、ST2146の存在によって影響を受けていないからである(逆もまた同じ;データは示さず)。曲線3は、飽和非ビオチン化ST2485(対照)の存在下でビオチン化ST2485を播いた場合に得られたシグナルを示す。

30

【0098】

図13bは、テネイシンCで感作されたマイクロプレートにおいて、単独または共に、飽和用量にてビオチン化抗体ST2485およびST2146が分配された、相加性試験を示す:2つの抗体の混合物はシグナルの和と同一のシグナルを生じ、したがって、これら2つの抗体の結合は相加的であることが示された。

40

【0099】

これら2つの抗体のインビトロ相加性はまた、図14および14aに示すようにBIAcore分析を用いてアッセイした。テネイシンを記載された方法にしたがって(De Santis R.; et al.; Br. J. Cancer, 88: 996-1003, 2003)、チップ(CM5 センサーチップ、Biosense)に固定化した。2つの第一の抗体の連続注射を飽和濃度(10  $\mu\text{M}$ )で投与し(aにおいてST2485、cにおいてST2146)、次いで第二の抗テネイシン抗体を注射した(aにおいてST2146、cにおいてST2485)。センサーグラム、aおよびc)は、これら2つの抗体が、各単一の抗体に

50

よって生じる共鳴シグナルにおける増加によって示されるように、対応するエピトープに相加的にそれぞれに結合することが出来ることを示す。センサーグラムb)およびd)は、それぞれ、アイソタイプ一致(isotypic)対照抗体、mIgG2bおよびmIgG1を後で投与した、S T2485およびST2146の注射を示す。

【 0 1 0 0 】

2つの抗体ST2485およびST2146の相加性研究を以前に記載された動物モデルにおいてインビボでも行った。研究スキームを図15に示し、腫瘍1g当たりの抗体ngとして表した、得られた結果を図16に示す。データは、動物モデルにおいても2つの抗体が相加性を示すことを確認する。2つの標識化抗体の混合物は、実際、理論値(2つの個々の標識化抗体の数学的和)の93%に達する腫瘍における蓄積を示した。対照動物の群を、干渉を避けるため放射標識化抗体および第二の「非放射性」抗体の混合物で処理した。

10

【 0 1 0 1 】

カッパ軽鎖の可変領域を環状 cDNAから出発して抗体の軽鎖定常領域を認識するプライマー対(5' GGGAGATGG-ATACAGTTGGTG 3' (配列番号5)、5' CAAGAGCTTCAACAGGAAT-GAG 3' (配列番号6))を用いてM. Sassano, et al., Nucl. Ac. Res., (1994) 22、1768-1769に記載のように増幅した。

【 0 1 0 2 】

ガンマ重鎖の可変領域を環状 cDNAから出発して抗体の重鎖定常領域を認識するプライマー対(5' ATGGAGTTAG-TTTGGGCAGCAG 3' (配列番号7)、5' GCACAACCACCATACTGAG-AAG 3' (配列番号8))を用いて M. Sassano, et al., Nucl. Ac. Res., (1994) 22、1768-1769に記載のように増幅した。

20

【 0 1 0 3 】

図17は、ST2485の軽鎖可変領域(VL)の配列である配列番号1を示す。

【 0 1 0 4 】

図18は、ST2485の重鎖可変領域(VH)の配列である配列番号2を示す。

【 0 1 0 5 】

BC-2と比較してのST2485の比較特徴決定により、抗体ST2485は以下の特徴を有することが示された:

- 抗体ST2485は、BC-2のエピトープに近いまたは部分的に重複するヒトテネイシンのA<sub>(1-4)</sub>-D 領域内にあるエピトープを認識する;
- 抗体ST2485は、観察される不均質性が軽鎖グリコシル化バリエーションに起因するという点で軽鎖および重鎖の組成に関して均質な抗体である;
- 抗体ST2485は、BC-2より免疫反応性が高い;
- 抗体ST2485は、抗原に対してBC-2よりも高い親和性を有する;
- 抗体ST2485は、ピオチン化の後の免疫反応性の維持に関してBC-2に匹敵する;
- 抗体ST2485は、動物モデルにおける腫瘍局在化に関してBC-2よりも優れている;
- 抗体ST2485は、インビトロおよび動物モデルにおけるインビボの両方で抗-テネイシンモノクローナル抗体ST2146と共に相加的にテネイシンCに結合する。

30

【 0 1 0 6 】

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.

40

Bourdon M.A., Wikstrand C.J., Furthmayr H., Matthews T.J., Bigner D.D. Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody. Cancer Res., 43(6):2796-2805, 1983.

Chinol M., Casalini P., Maggiolo M., Canevari S., Omodeo E.S., Caliceti P., Veronese F.M., Cremonesi M., Chiolerio F., Nardone E., Siccardi A.G., Paganelli G. B

50

biochemical modifications of avidin improve pharmacokinetics and biodistribution, and reduce immunogenicity. *British Journal of Cancer*, 78(2): 189-197, 1998.

Chiquet-Ehrismann R, Mackie E. J., Pearson C.A., Sakakura T. Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell*, 47(1):131-139, 1986.

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. 10

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.

De Santis R., Anastasi A.M., D'Alessio V., Pelliccia A., Albertoni C., Rosi A., Leoni B., Lindsedt R., Petronzelli F., Dani M., Verdoliva A., Ippolito A., Campanile A., Manfredi V., Esposito A., Cassani G., Chinol M., Paganelli G. and Carminati P. Novel antitenascin antibody with increased localisation for Pretargeted Antibody-Guided Radioimmunotherapy (PAGRIT). *Br. J. Cancer*, 88, 996-1003, 2003. 20

Di Massimo A.M., Di Loreto M., Pacilli A., Raucci G., D'Alatri L., Mele A., Bologna A., Polito L., Stirpe F. and De Santis R. Immunoconjugates made of an anti-EGF-receptor Monoclonal Antibody and Type 1 R1Ps from *Saponaria ocymoides* or *Vaccaria pyramidata*. *Br. J. Cancer*, 75(6):822-828, 1997.

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. 30

Grana C., Chinol M., Robertson C., Mazzetta C., Bartolomei M., De Cicco C., Fiorenza M., Gatti M., Caliceti P. and Paganelli G. Pretargeted adjuvant radioimmunotherapy with Yttrium-90-biotin in malignant glioma patients: a pilot study. *Br. J. Cancer*, 86: 207-212, 2002.

Natali PG., Nicotra M.R., Bigotti A., Botti C., Castellani P., Risso A.M. and Zardi L. Comparative analysis of the expression of the extracellular matrix protein tenascin in normal human fetal, adult and tumor tissues. *Int. J. Cancer*, 47: 811-816, 1991. 40

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 local regional radioimmunotherapy with <sup>90</sup>Y-biotin in glioma patients: Phase I study and preliminary therapeutic results. *Cancer Biother. & Radiopharm.*, 16(3):227-235, 2001.

Paganelli G., Grana C., Chinol M., Cremonesi M., De Cicco C., De Braud F., Robertson C., Zurrida S., Casadio C., Zoboli S., Siccardi A. G., Veronesi U. Antibody 50

-guided three step therapy for high grade glioma with yttrium-90 biotin. *Eur. J. Nucl. Med.*, 26(4):348-357, 1999.

Paganelli G., Magnani P., Zito F., Lucignani G., Sudati F., Truci G., Motti E., Terreni M., Pollo B., Giovanelli M. Pre-targeted immunodetection in glioma patients: tumor localization and single-photon emission tomography imaging of [<sup>99m</sup>Tc] PnAO-biotin. *Eur. J. Nucl. Med.*, 21(4):314-21, 1994.

Parente D., D'Alatri L., Di Massimo A.M., 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. 10

Penichet, ML., Kang YS., Pardridge WM., Morrison SL., and Shin S.U. 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: 44214426, 1999.

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. 20

Riva P., Arista A., Sturiale C., Moscatelli G., Tison V., Mariani M., Seccamani E., Lazzari S., Fagioli L., Franceschi G., et al. Treatment of intracranial human glioblastoma by direct administration of <sup>131</sup>I-labelled anti-tenascin monoclonal antibody BC-2. *Int. J. Cancer*, 51(1):7-13, 1992.

Riva P., Franceschi G., Arista A., Frattarelli M., Riva N., Cremonini A.M., Giuliani G., Casi M. Local application of radiolabeled monoclonal antibodies in the treatment of high grade malignant glioma: a six-year clinical experience. *Cancer*, 80 (12 Suppl):2733-42, 1997. 30

Riva P., Franceschi G., Frattarelli M., Riva N., Guiducci G., Cremonini A.M., Giuliani G., Casi M., Gentile R., Jekunen A.A., Kairemo K.J. <sup>131</sup>I radioconjugated antibodies for the locoregional radioimmunotherapy of high-grade malignant glioma - phase I and II study. *Acta Oncol.*, 38(3):351-9, 1999.

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. 40

【図面の簡単な説明】

【 0 1 0 7 】

【図 1】ヒトネイシン CおよびBC-2-様抗体の作成に用いた戦略の略図。

【図 2】還元および非還元条件下における抗体ST2485のSDS-PAGE (a、b)およびウェスタンブロット(c、d)分析。還元条件下において、抗体の軽鎖のレベルにてダブルバンドが観察される(b、d)。

【図 3】酵素 PNGaseF (*Flavobacterium*由来ペプチド-N-グリコシダーゼ)での消化による脱グリコシル化に供された抗体ST 2485のSDS-PAGE 分析:高分子量軽鎖バンドの消失が観察される。

【図4】抗体ST2485およびBC-2のヒドロキシアパタイトクロマトグラフィープロファイル。

【図5】ウェスタンブロット分析によるヒトテネイシンおよびTn (A<sub>(1-4)</sub>-D) 断片に対するST2485の結合特異性。

【図6】テネイシン C (a)またはTn (A<sub>(1-4)</sub>-D) 断片 (b)に対する結合についてのST2485とBC-2との間の競合ELISA。

【図7】テネイシン C (a)およびTn (A<sub>(1-4)</sub>-D) 断片 (b)に対するBC-2と比較したST2485の免疫反応性。

【図8】テネイシン C (a)およびTn (A<sub>(1-4)</sub>-D) 断片 (b)に対するビオチン化 ST2485およびBC-2の免疫反応性。

【図9】LMM3 腫瘍 (マウス乳癌)および正常マウス腸において発現するマウステネイシンとの抗体ST2485の交差反応性。

【図10】ヌードマウスにおけるST2485 生体内分布研究に採用したプロトコール。

【図11】BC-2と比較した様々な投与用量でのST2485の生体内分布。投与したすべての用量において、腫瘍におけるST2485の蓄積は少なくともBC-2の2倍である。

【図12】BC-2と比較したST2485の腫瘍対非腫瘍比。これらの比は投与したすべての用量において抗体ST2485の方が高い。

【図13】ELISA試験による抗テネイシン抗体ST2485およびST2146のインビトロ干渉 (a)および相加性試験 (b)。

【図14】BiaCore 分析による抗体ST2485およびST2146のインビトロ相加性試験。

【図15】抗体ST2485およびST2146のインビボ相加性研究に採用したスキーム。

【図16】腫瘍1gあたりに局在している抗体のngにて表した、抗体ST2485およびST2146のインビボ相加性。

【図17】配列番号1、ST2485軽鎖可変領域(VL)の配列。コードされるアミノ酸配列は配列番号3に示す。

【図18】配列番号2、ST2485重鎖可変領域(VH)の配列。コードされるアミノ酸配列は配列番号4に示す。

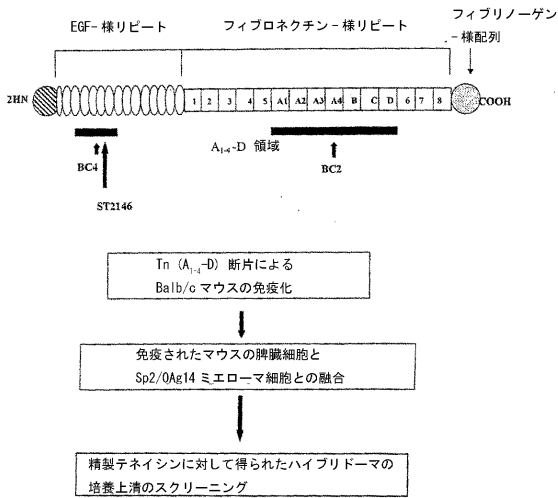
10

20

【 図 1 】

Figure 1

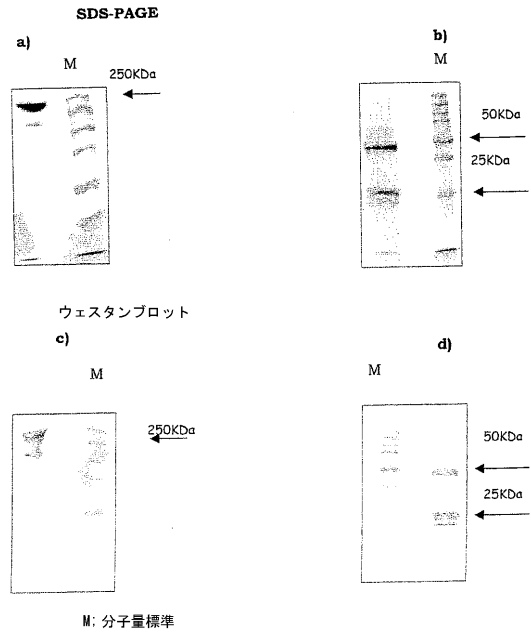
ヒトテネascin C および BC-2-様抗体の作成に用いた戦略の略図



【 図 2 】

Figure 2

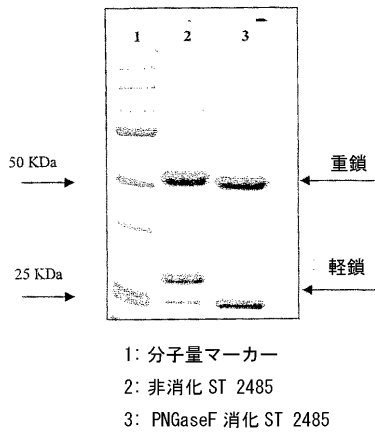
還元 (b, d) および非還元 (a, c) 条件下における ST2485 抗体の SDS-PAGE およびウェスタンブロット分析



【 図 3 】

Figure 3

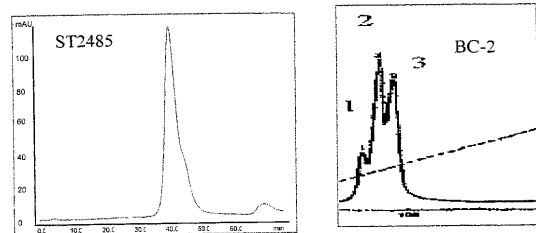
Flavobacterium ペプチド-N-グリコシダーゼ酵素 (PNGaseF) での ST 2485 抗体の消化



【 図 4 】

Figure 4

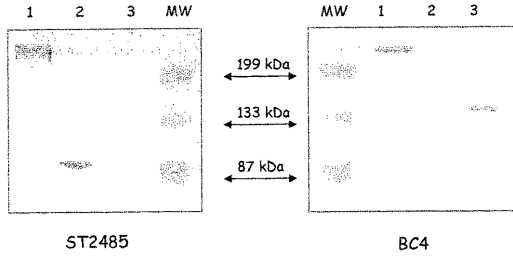
BC-2 および ST2485 抗テネascin抗体の ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー



【 図 5 】

Figure 5

ST2485 抗テネイン抗体のウェスタンブロット分析

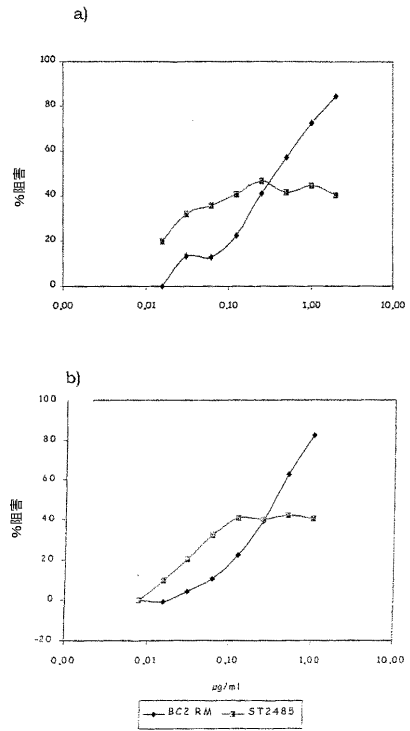


- 1: テネイン-C
- 2: Tn (A<sub>(1-4)</sub>-D) 断片
- 3: BC-4 抗体によって認識されるエピトープを含む  
テネイン EGF 様領域組換え断片
- MW: 分子量標準

【 図 6 】

Figure 6

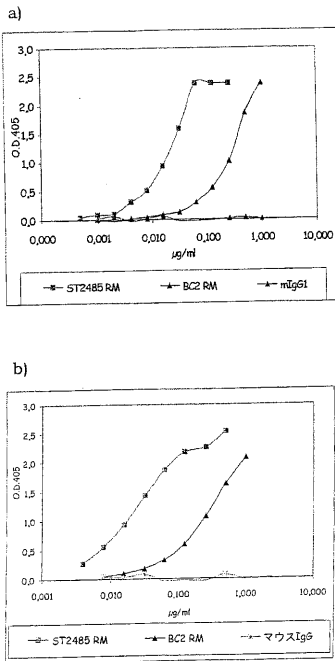
抗原結合についての ST2485 と BC-2 との間の競合 ELISA 試験



【 図 7 】

Figure 7

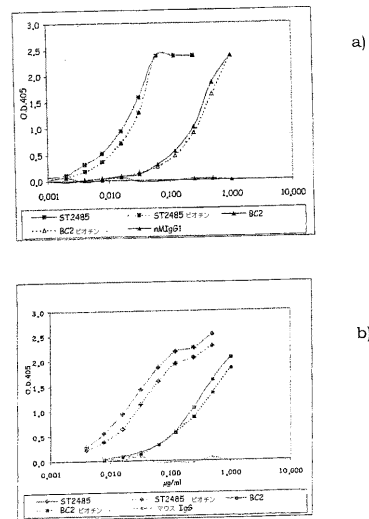
テネイン C (a) および Tn (A<sub>(1-4)</sub>-D) 断片 (b) に対する BC-2 と比較した ST2485 抗体の免疫反応性



【 図 8 】

Figure 8

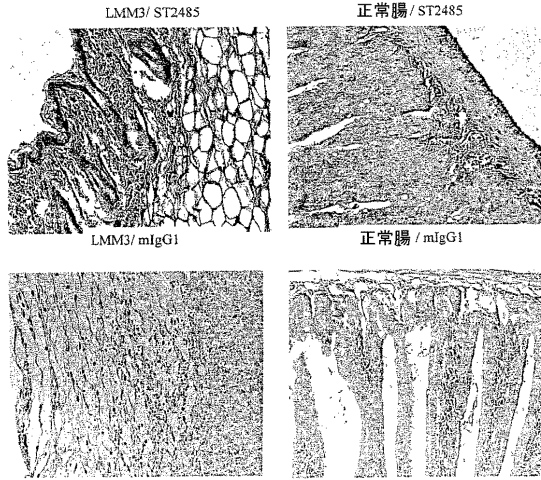
テネイン C (a) および Tn (A<sub>(1-4)</sub>-D) 断片 (b) に対する ビオチン化および非ビオチン化抗体 ST2485 および BC-2 の免疫反応性



【 図 9 】

Figure 9

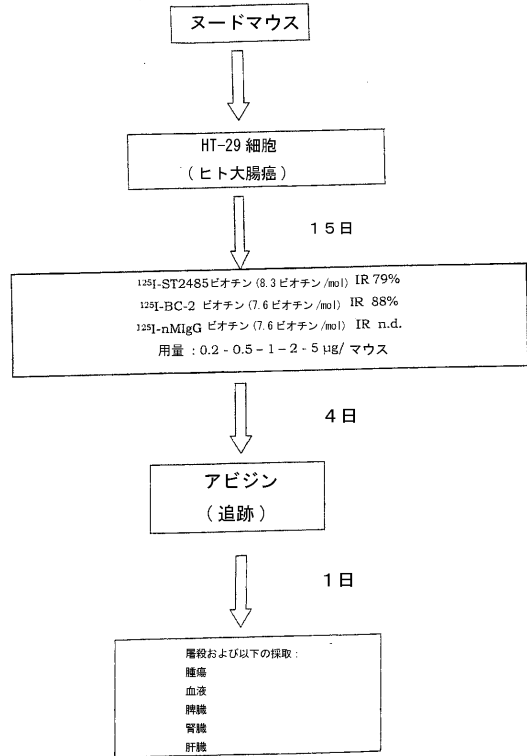
マウスネイシンとの ST2485 抗体の交差反応性



【 図 1 0 】

Figure 10

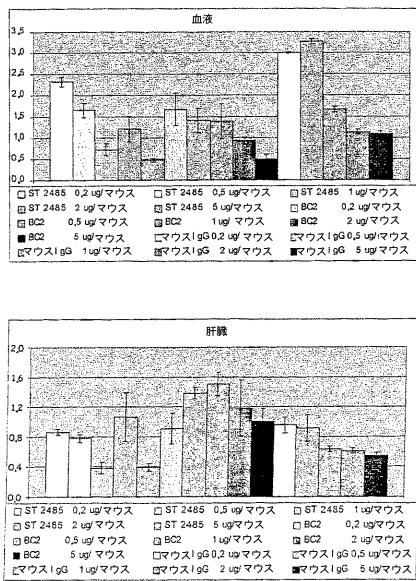
ヒトネイシン発現腫瘍移植ヌードマウスにおける  
ビオチン化 ST2485 および BC-2 抗体の生体内分布研究  
プロトコール



【 図 1 1 】

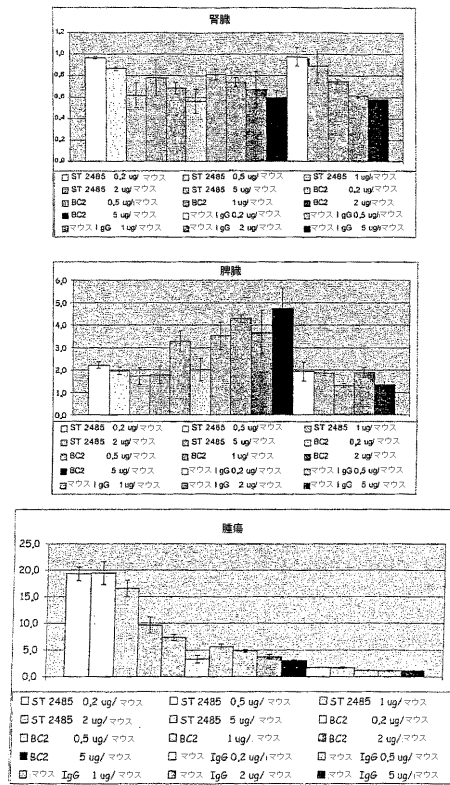
Figure 11

ヒトネイシン発現腫瘍移植ヌードマウスにおける  
ビオチン化 ST2485 および BC-2 の生体内分布  
抗体量は組織 1g 当たりの注入用量のパーセント  
として表す (%I.D./gr)



【 図 1 2 - a 】

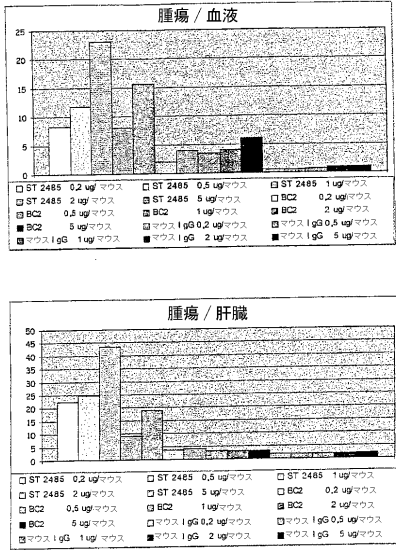
Figure 11a



【 図 1 3 】

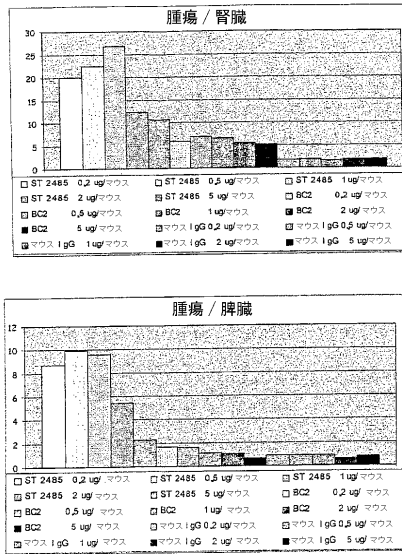
Figure 12

ヌードマウスにおけるピオチン化 ST2485 および BC-2 の生体内分布：腫瘍 / 非腫瘍比



【 図 1 4 - a 】

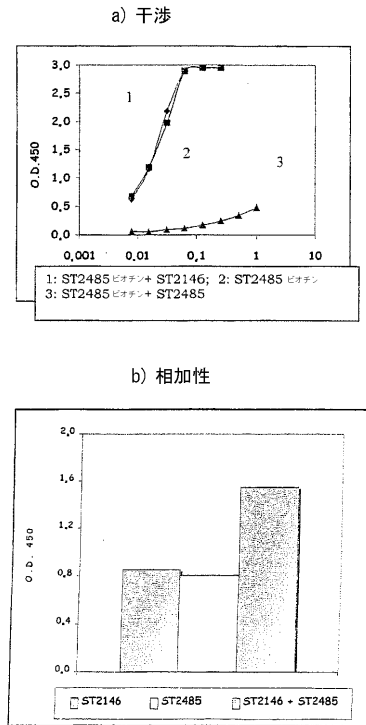
Figure 12a



【 図 1 5 】

Figure 13

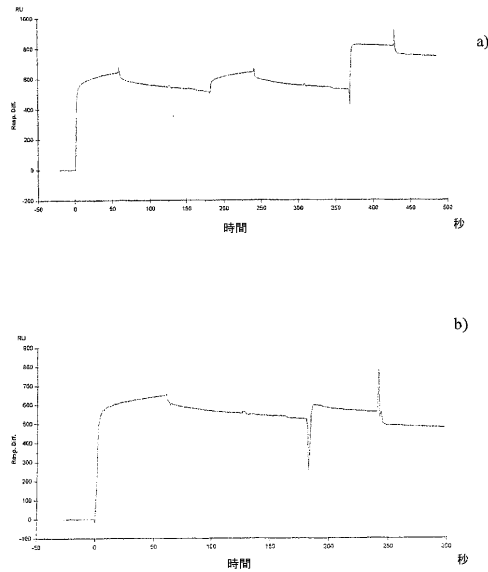
ELISA 試験による ST2485 および ST2146 抗テネイシン抗体のインビトロ干渉 (a) および相加性 (b) の評価



【 図 1 6 】

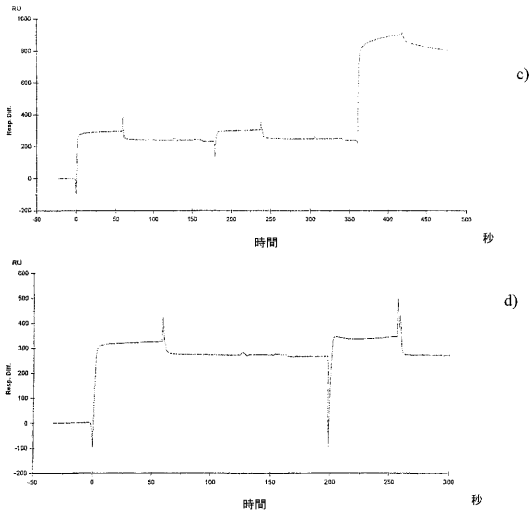
Figure 14

BIA Core による抗体 ST2485 および ST2146 テネイシン結合のインビトロ相加性



【 図 17 - a 】

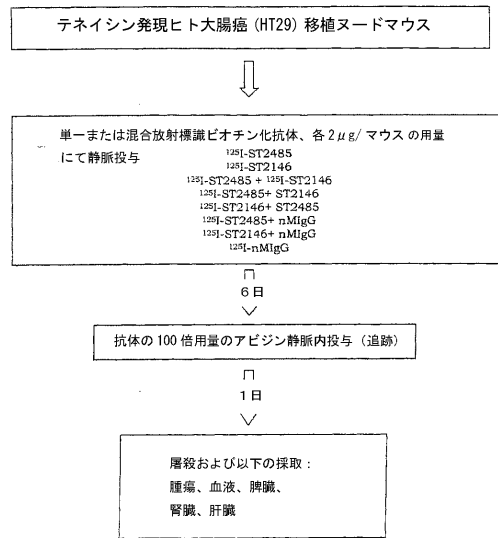
Figure 14a



【 図 18 】

Figure 15

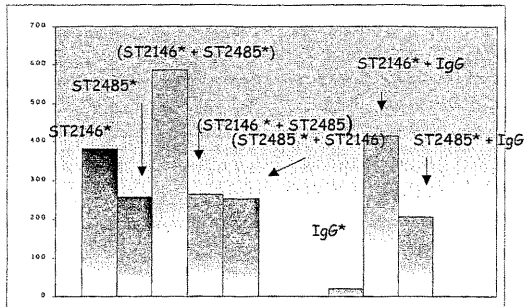
動物モデルにおけるインビボ相溶性研究のスキーム表示



【 図 19 】

Figure 16

動物モデルにおける ST2485 および ST2146 抗体の相溶性；  
腫瘍病巣局在化



【 図 20 】

Figure 17

配列番号 1、ST2485 カップ軽鎖可変領域 (VL) の配列

シグナルペプチド  
ATGGATTTCTCAAGTGCAGATTTTCAGCTCTCTGCTTATTCAGTCTTCAGTCTTATTTCTCTCAGAGGACAAA  
 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser Val Ile Met Ser Asp Gly Gln

TTGTTCTCTCCAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGCACTCCAGGGGAGAAAGGTCACAATGACTTGC  
 Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys

↓ N-グリコシル化  
 CDR1  
 AGGGCCAACTCAAGTGTACCTTTCATGCACCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACC  
 Arg Ala Asn Ser Ser Val Arg Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys

CDR2  
 CTGGATTTATGCTATCTCCAGCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGCTGG  
 Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly

CDR3  
 GACCTCTTATCTGTCAACAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGC  
 Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Val Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln

ATGTCAGSERGHTATTGACCCAGGACGTTCCGTTGGAGGCCACCAAGTGGAAATCAGACGGGCT  
 Gln Trp Ser Ser Asn Ser Pro Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Arg Arg Ala



【図 8】テネイシン C (a) および Tn (A<sub>(1-4)</sub>-D) 断片 (b) に対するピオチン化 ST2485 および BC-2 の免疫反応性。

【図 9】LMM3 腫瘍 (マウス乳癌) および正常マウス腸において発現するマウステネイシンとの抗体 ST2485 の交差反応性。

【図 10】ヌードマウスにおける ST2485 生体内分布研究に採用したプロトコール。

【図 11 - 1】BC-2 と比較した様々な投与用量での ST2485 の生体内分布。

【図 11 - 2】BC-2 と比較した様々な投与用量での ST2485 の生体内分布。

【図 12 - 1】BC-2 と比較した ST2485 の腫瘍対非腫瘍比。

【図 12 - 2】BC-2 と比較した ST2485 の腫瘍対非腫瘍比。

【図 13】ELISA 試験による抗テネイシン抗体 ST2485 および ST2146 のインビトロ干渉 (a) および相加性試験 (b)。

【図 14 - 1】BiaCore 分析による抗体 ST2485 および ST2146 のインビトロ相加性試験。

【図 14 - 2】BiaCore 分析による抗体 ST2485 および ST2146 のインビトロ相加性試験。

【図 15】抗体 ST2485 および ST2146 のインビボ相加性研究に採用したスキーム。

【図 16】腫瘍 1g 当たり に局在している抗体の ng にて表した、抗体 ST2485 および ST2146 のインビボ相加性。

【図 17】配列番号 1、ST2485 軽鎖可変領域 (VL) の配列。コードされるアミノ酸配列は配列番号 3 に示す。

【図 18】配列番号 2、ST2485 重鎖可変領域 (VH) の配列。コードされるアミノ酸配列は配列番号 4 に示す。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

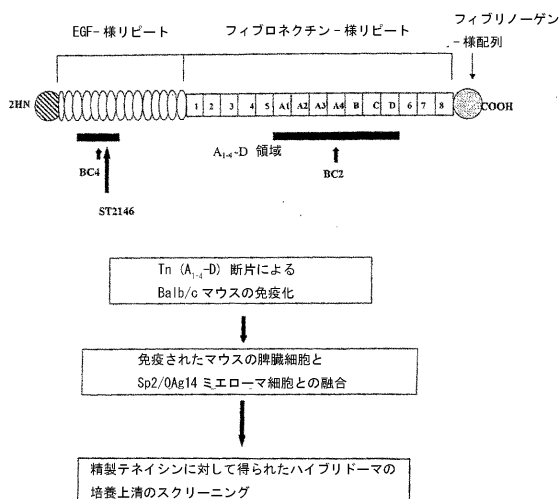
【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 1】

Figure 1

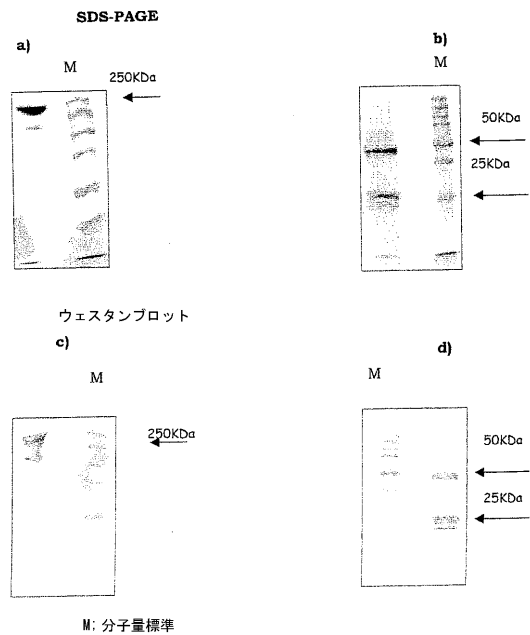
ヒトテネイシン C および BC-2-様抗体の作成に用いた戦略の略図



【図 2】

Figure 2

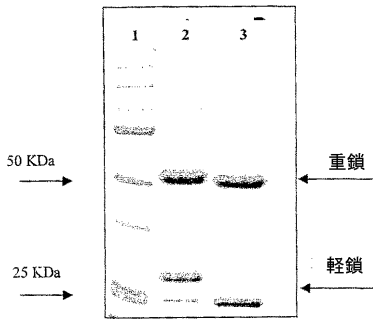
還元 (b, d) および非還元 (a, c) 条件下における ST2485 抗体の SDS-PAGE およびウェスタンブロット分析



【 図 3 】

Figure 3

Flavobacterium ペプチド-N-グリコシダーゼ酵素 (PNGaseF) での ST 2485 抗体の消化

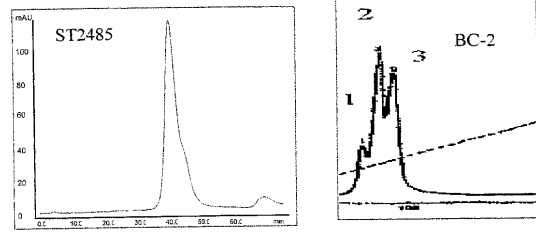


- 1: 分子量マーカー
- 2: 非消化 ST 2485
- 3: PNGaseF 消化 ST 2485

【 図 4 】

Figure 4

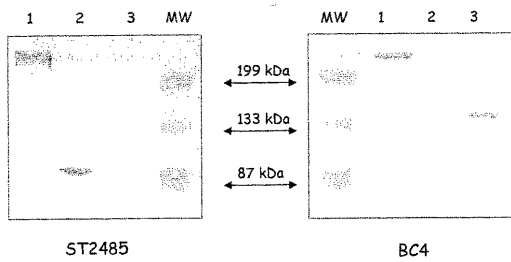
BC-2 および ST2485 抗テネイシン抗体のヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー



【 図 5 】

Figure 5

ST2485 抗テネイシン抗体のウェスタンブロット分析



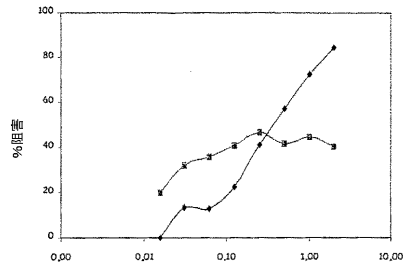
- 1: テネイシン-C
- 2: Tn (A<sub>(1-4)</sub>-D) 断片
- 3: BC-4 抗体によって認識されるエピトープを含む  
テネイシン EGF 様領域組換え断片
- MW: 分子量標準

【 図 6 】

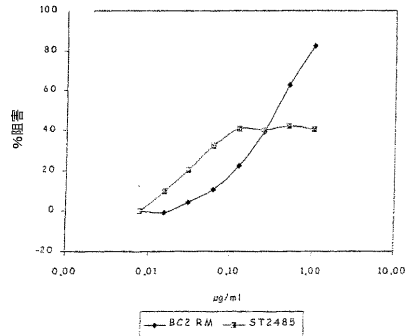
Figure 6

抗原結合についての ST2485 と BC-2 との間の競合 ELISA 試験

a)



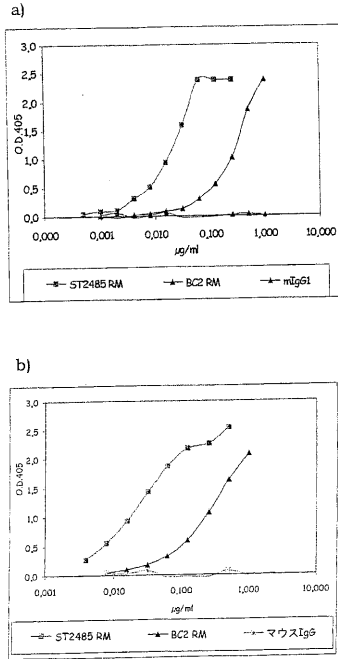
b)



【 図 7 】

Figure 7

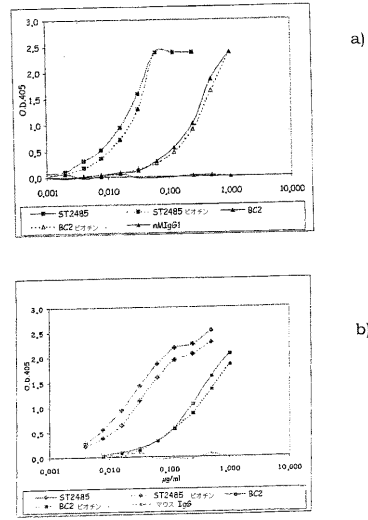
テネイシン C (a) および Tn (A<sub>(1-4)</sub>-D) 断片 (b) に対する BC-2 と比較した ST2485 抗体の免疫反応性の免疫反応性



【 図 8 】

Figure 8

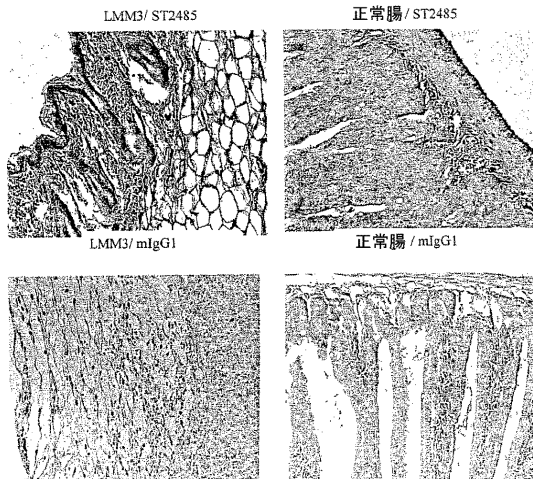
テネイシン C (a) および Tn (A<sub>(1-4)</sub>-D) 断片 (b) に対する ビオチン化および非ビオチン化抗体 ST2485 および BC-2 の免疫反応性



【 図 9 】

Figure 9

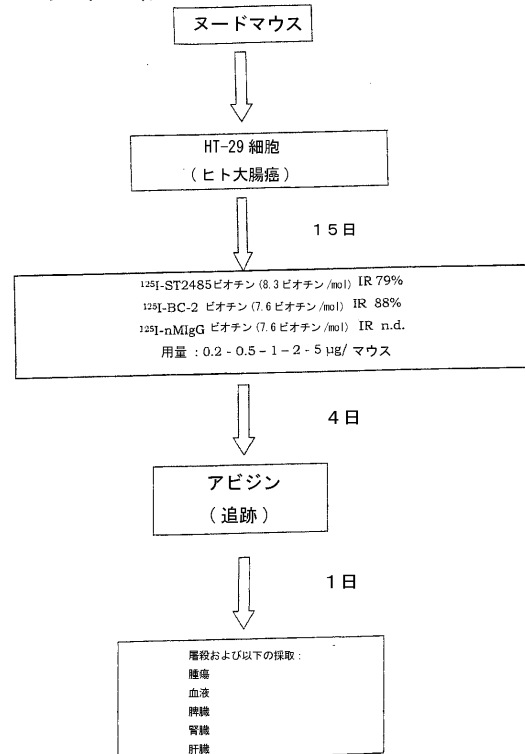
マウステネイシンとの ST2485 抗体の交差反応性



【 図 10 】

Figure 10

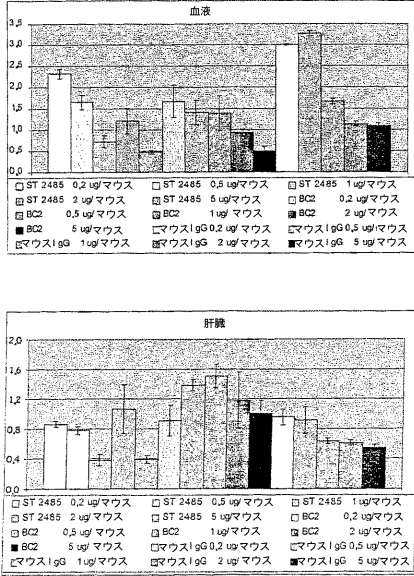
ヒトテネイシン発現腫瘍移植ヌードマウスにおける ビオチン化 ST2485 および BC-2 抗体の生体内分布研究 プロトコール



【 図 1 1 - 1 】

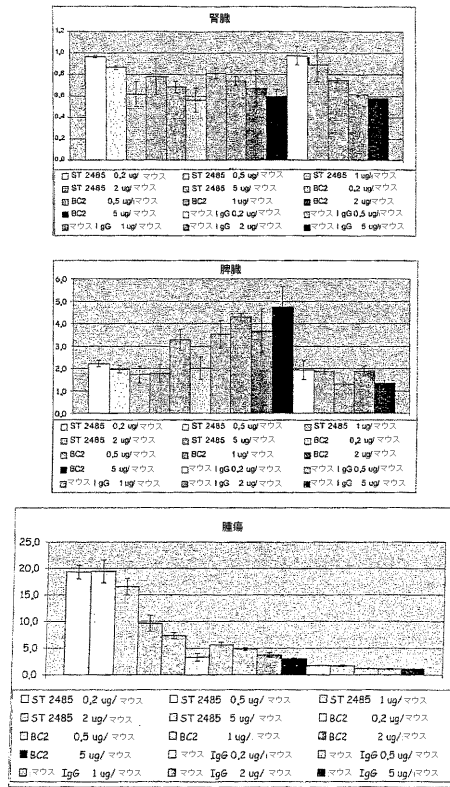
Figure 11

ヒトテネイシン発現腫瘍移植ヌードマウスにおける  
ビオチン化 ST2485 および BC-2 の生体内分布  
抗体量は組織 1g 当たりの注入用量のパーセント  
として表す (%I.D./gr)



【 図 1 1 - 2 】

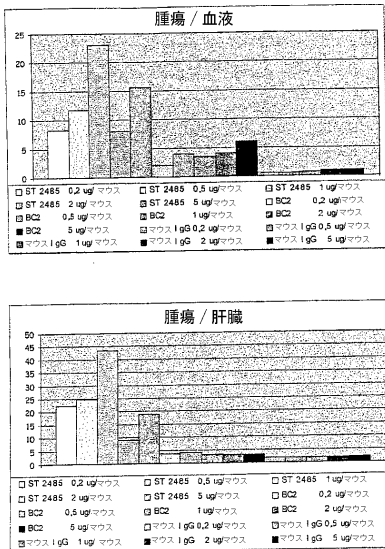
Figure 11a



【 図 1 2 - 1 】

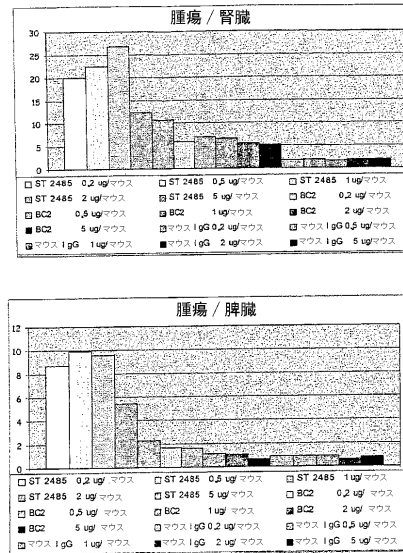
Figure 12

ヌードマウスにおけるビオチン化 ST2485  
および BC-2 の生体内分布：腫瘍 / 非腫瘍比



【 図 1 2 - 2 】

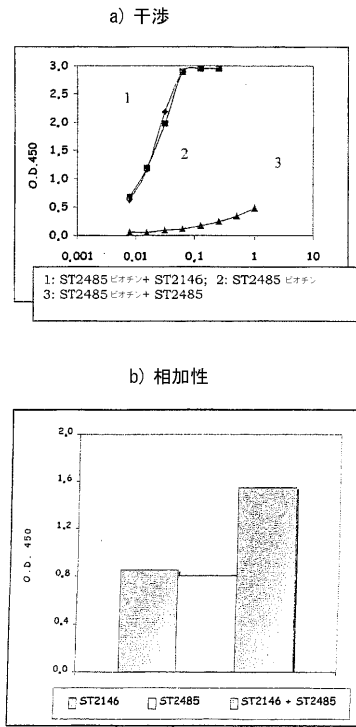
Figure 12a



【 図 1 3 】

Figure 13

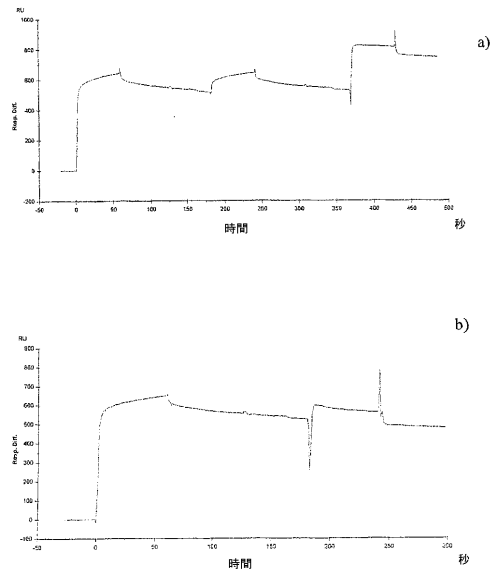
ELISA 試験による ST2485 および ST2146 抗テネイン抗体のインビトロ干渉 (a) および相加性 (b) の評価



【 図 1 4 - 1 】

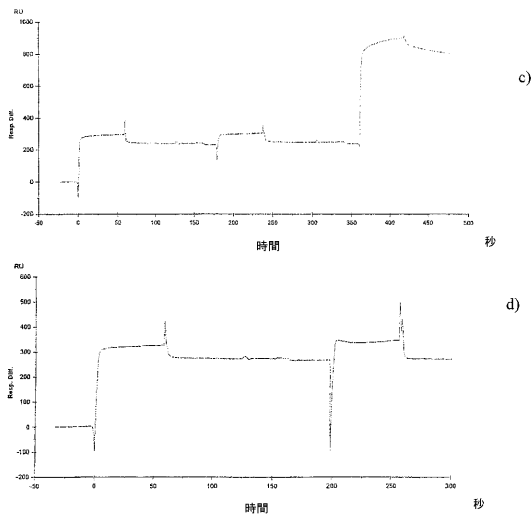
Figure 14

BIA Core による抗体 ST2485 および ST2146 テネイン結合のインビトロ相加性



【 図 1 4 - 2 】

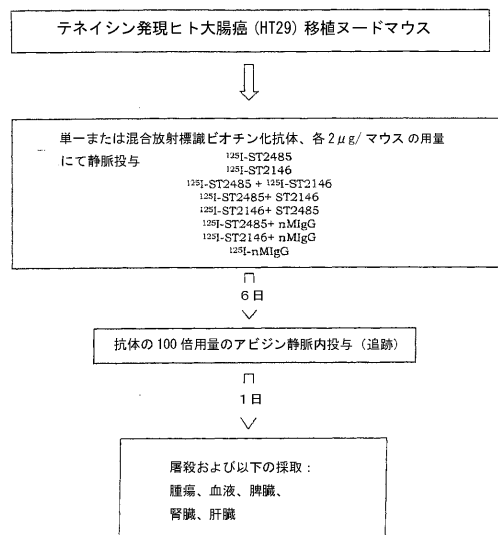
Figure 14a



【 図 1 5 】

Figure 15

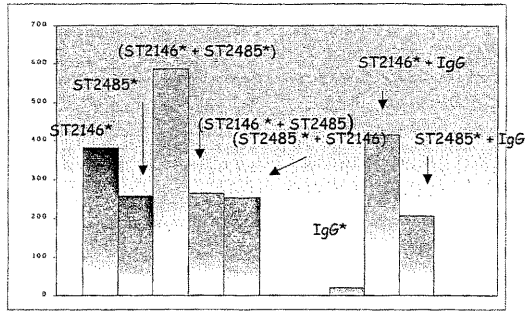
動物モデルにおけるインビトロ相加性研究のスキーム表示



【 図 1 6 】

Figure 16

動物モデルにおける ST2485 および ST2146 抗体の相加性；  
腫瘍病巣局在化



【 図 1 7 】

Figure 17

配列番号 1、ST2485 カッパ軽鎖可変領域 (VL) の配列

シグナルペプチド  
ATGGATTTCAGTTCAGATTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTCTCAGTATATGTCCTAGAGGACAAA  
 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser Val Ile Met Ser Asp Gly Gln

TGTTCTCTCCAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGCACTCCAGGGGAGAAGGTCCACAATGACITGCG  
 Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys

N-グリコシル化  
 CDR1  
AGGGCACTGCAAGTGTACGTTTCATGCACCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACC  
 Arg Ala Asn Ser Ser Val Arg Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys

CDR2  
CTGGATTATGCAATCCCACTGGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGCTCTGG  
 Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly

CDR3  
GACCTTTATCTGTCAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGC  
 Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Val Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln

AATGGAGTGTAAATCACCCAGGACCTTCGGTGGAGGCCAAGTGGAAATCAGACGGGCT  
 Gln Trp Ser Ser Asn Ser Pro Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Arg Arg Ala

【 図 1 8 】

Figure 18

配列番号 2、ST2485 ガンマ重鎖可変領域 (VH) の配列

シグナルペプチド  
ATGGGATGGAGCTGGATCTTCTCTCTCTCTGATGAGCAATGAGGCTGTCATCTGAGGTCCAGCTG  
 Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gln Thr Ala Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu

CAAGAGCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCTGGAGCTTCAATGAAGATTCTGCAAGGCTTCTGG  
 Gln Gln Ser Gly Pro Gln Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser

CDR1  
TTACTAATTCACATGCTACTGCACTGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAACCTTGAATGGA  
 Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Gln Trp

CDR2  
TTGGACTTATAACCTGACAAATGAGGTGATACCTTCAACCAAGTTCAGGGCAAGGCCACA  
 Ile Gly Leu Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr

TTAACTGTAGACAAGTCAATCCAACAGGCTACATGGAGCTCTCAGTGTGACATCTGAGGACTC  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Leu Thr Ser Gln Asp

CDR3  
FGAGTCTATTACTGTACAAGACCCGAGGATTAAGTGTCTTGGATGCTGGGGCCAGGGA  
 Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Pro Gly Gly Tyr Tyr Trp Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly

CCACGGTCACCGTCTCTCA  
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

【手続補正書】

【提出日】平成18年11月15日(2006.11.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2008506355000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/IT2005/000078

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C07K16/30		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, Sequence Search		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/072608 A (SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE, S.P.A) 4 September 2003 (2003-09-04) claims 1-34 page 13, paragraph 3; claim 31	1-34
X	US 6 335 014 B1 (KUSAKABE MORIAKI) 1 January 2002 (2002-01-01) column 3, lines 6-10 column 4, lines 38-42	1-34
Ø	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
° Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*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
*E* earlier document but published on or after the international filing date		*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
*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)		*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.
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
26 October 2005	08/11/2005	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Marchesini, P	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/IT2005/000078

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>SIRI A ET AL: "HUMAN TENASCIN: PRIMARY STRUCTURE, PRE-MRNA SPLICING PATTERNS AND LOCALIZATION OF THE EPITOPES RECOGNIZED BY TWO MONOCLONAL ANTIBODIES" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 19, no. 5, 1991, pages 525-531, XP000919423 ISSN: 0305-1048 abstract</p> <p>-----</p>	1-34
Y	<p>BALZA ENRICA ET AL: "Production and characterization of monoclonal antibodies specific for different epitopes of human tenascin" FEBS (FEDERATION OF EUROPEAN BIOCHEMICAL SOCIETIES) LETTERS, vol. 332, no. 1-2, 1993, pages 39-43, XP002349140 ISSN: 0014-5793 abstract</p> <p>-----</p>	1-34
Y	<p>PAGANELLI G ET AL: "ANTIBODY-GUIDED THREE-STEP THERAPY FOR HIGH GRADE GLIOMA WITH YTTRIUM-90 BIOTIN" EUROPEAN JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, BERLIN, DE, vol. 26, no. 4, April 1999 (1999-04), pages 348-357, XP008019281 ISSN: 0340-6997 abstract</p> <p>-----</p>	1-34

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.  
 PCT/IT2005/000078
**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 17-20, 29, 31-32  
 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
 Although claims 17-20, 29, 31 are directed to diagnostic methods and /or method of treatment practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.:  
 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/IT2005/000078

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03072608	A	04-09-2003	
		AU 2003215900 A1	09-09-2003
		BR 0307994 A	07-12-2004
		CA 2475395 A1	04-09-2003
		CN 1639192 A	13-07-2005
		EP 1478667 A1	24-11-2004
US 6335014	B1	01-01-2002	NONE

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	
C 1 2 M 1/24 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 M 1/24	
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 B	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/02 C	
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/00	
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/577 B	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 U	
	G 0 1 N 33/574 A	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 リタ・デ・サンティス  
イタリア、イ - 0 0 0 4 0 ポメツィア、ヴィア・ポンティーナ、キロメートル 3 0 , 4 0 0、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 アンジェラ・ペッリッチャ  
イタリア、イ - 0 0 0 4 0 ポメツィア、ヴィア・ポンティーナ、キロメートル 3 0 , 4 0 0、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 ジョヴァンナ・パロンボ  
イタリア、イ - 8 1 0 1 3 ピアーナ・ディ・モンテ・ヴェルナ (カゼルタ)、ロカリータ・ラ・ファジャネリア、テクノジェン・ソシエタ・コンソルティーレ・ペル・アチオニ内

(72) 発明者 バオロ・カルミナティ  
イタリア、イ - 0 0 0 4 0 ポメツィア、ヴィア・ポンティーナ、キロメートル 3 0 , 4 0 0、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

F ターム (参考) 4B024 AA01 AA12 BA45 BA80 CA04 DA02 GA03  
4B029 AA07 BB17 FA03  
4B063 QA19 QQ02 QQ79 QR48 QR56 QS33  
4B064 AG27 CA20 CC24 DA05 DA14  
4B065 AA92X AA92Y AB04 AC14 BA01 BA08 CA44 CA46  
4C084 AA21 MA02 NA05 NA14 ZB211 ZB261 ZB262 ZC712 ZC751 ZC752  
4C085 AA14 BB01 CC02 DD62 EE01 EE03 HH03 JJ01 KA29 KB18  
KB82 LL18  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA41 DA76 EA20 EA51 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008506355A5</a>	公开(公告)日	2008-04-17
申请号	JP2007500356	申请日	2005-02-16
申请(专利权)人(译)	TECHNO仁Soshietta佩尔 - Achioni		
[标]发明人	リタデサンティス アンジェラベッリッチャ ジョヴァンナパロンボ パオロカルミナティ		
发明人	リタ・デ・サンティス アンジェラ・ベッリッチャ ジョヴァンナ・パロンボ パオロ・カルミナティ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 C12M1/24 C12Q1/04 C12M1/34 A61K45/00 A61K39/395 A61K51/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P43 /00 G01N33/577 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	C07K16/30 A61K2039/505 C07K16/18 C07K2317/56 C07K2317/92 Y10S435/81		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/18 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12N5/00.B C12N15/00.C C12P21/08 C12M1/24 C12Q1/04 C12M1/34.B A61K45/00 A61K39/395.T A61K49/02.C A61P35/00 A61P37/00 A61P43/00.121 G01N33/577.B G01N33/53.U G01N33/574.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA45 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/GA03 4B029 /AA07 4B029/BB17 4B029/FA03 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QS33 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA92X 4B065 /AA92Y 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA21 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZB211 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZC712 4C084/ZC751 4C084/ZC752 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/CC02 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085 /EE03 4C085/HH03 4C085/JJ01 4C085/KA29 4C085/KB18 4C085/KB82 4C085/LL18 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA51 4H045 /FA74		
代理人(译)	田中，三夫 櫻井洋子		
优先权	102004901189706 2004-02-27 IT		
其他公开文献	JP2008506355A JP5191036B2		

#### 摘要(译)

描述了抗人肌腱蛋白单克隆抗体，其轻链和重链可变区序列分别是SEQ ID 1和SEQ ID 2，其蛋白水解片段能够结合区域A ( 1-4 ) - D内的抗原表位。人肌腱蛋白，其重组衍生物，其缀合物及其相似的功能类似物，能够结合人肌腱蛋白的A ( 1-4 ) -D区内的抗原表位。

