

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6715770号
(P6715770)

(45) 発行日 令和2年7月1日(2020.7.1)

(24) 登録日 令和2年6月11日(2020.6.11)

(51) Int.Cl.	F I
C O 7 K 16/40 (2006.01)	C O 7 K 16/40 Z N A
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D
請求項の数 18 (全 42 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2016-541139 (P2016-541139)	(73) 特許権者	516178859
(86) (22) 出願日	平成26年12月18日 (2014.12.18)		アロセル エービー
(65) 公表番号	特表2017-503787 (P2017-503787A)		スウェーデン国, エス-754 50 ウ
(43) 公表日	平成29年2月2日 (2017.2.2)		ブサラ, バーディングズ アレ 32 ビ
(86) 国際出願番号	PCT/SE2014/051535		ー
(87) 国際公開番号	W02015/094106	(74) 代理人	100114775
(87) 国際公開日	平成27年6月25日 (2015.6.25)		弁理士 高岡 亮一
審査請求日	平成29年12月14日 (2017.12.14)	(74) 代理人	100121511
(31) 優先権主張番号	1351531-7		弁理士 小田 直
(32) 優先日	平成25年12月19日 (2013.12.19)	(74) 代理人	100202751
(33) 優先権主張国・地域又は機関	スウェーデン (SE)		弁理士 岩堀 明代
		(74) 代理人	100191086
			弁理士 高橋 香元
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】モノクローナル抗TK1抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトチミジンキナーゼ1 (TK1) の血清形態に結合することが可能なモノクローナル抗体またはモノクローナル抗体フラグメントであって、

i) 前記ヒトTK1のGEAVAARKLF (SEQ ID NO: 2) エピトープへの特異性を有し、かつ

アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 6) を有する可変重鎖 (VH) ドメイン相補性決定領域1 (CDR1) ;

アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 7) を有するVHドメインCDR2 ; および

アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 8) を有するVHドメインCDR3 ;

を有するアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 38) を有する可変重鎖 (VH) ドメイン、並びに

アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 9) を有する可変軽鎖 (VL) ドメインCDR1 ;

;

アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 10) を有するVLドメインCDR2 ; および

アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 11) を有するVLドメインCDR3、

を有するアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 40) を有する可変軽鎖 (VL) ドメインを有するか、

ii) 前記ヒトTK1のコンホメーション依存エピトープへの特異性を有し、かつ

アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 6) を有するVHドメインCDR1 ;

10

20

アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 12) を有する VH ドメイン CDR 2 ; および
 アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 13) を有する VH ドメイン CDR 3 ;
 を有するアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 42) を有する可変重鎖 (VH) ドメイン、並びに

アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 14) を有する VL ドメイン CDR 1 ;
 アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 10) を有する VL ドメイン CDR 2 ; および
 アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 11) を有する VL ドメイン CDR 3、
 を有するアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 44) を有する可変軽鎖 (VL) ドメインを有するか、または、

iii) 前記ヒト TK 1 の NCPVPGKPGE (SEQ ID NO: 4)、PVP GK PGEAV (SEQ ID NO: 5) および NCPVPGKPGEAV (SEQ ID NO: 3) のうちの少なくとも1つのエピトープへの特異性を有し、かつ

アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 15) を有する VH ドメイン CDR 1 ;
 アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 16) を有する VH ドメイン CDR 2 ; および
 アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 17) を有する VH ドメイン CDR 3 ;
 を有するアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 46) を有する可変重鎖 (VH) ドメイン、並びに

アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 18) を有する VL ドメイン CDR 1 ;
 アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 19) を有する VL ドメイン CDR 2 ; および
 アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 20) を有する VL ドメイン CDR 3、
 を有するアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 48) を有する可変軽鎖 (VL) ドメインを有する、モノクローナル抗体またはモノクローナル抗体フラグメント。

【請求項 2】

前記モノクローナル抗体またはフラグメントが、ヒト組換え TK 1 およびヒト TK 1 の細胞形態に結合することが可能である、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはフラグメント。

【請求項 3】

前記モノクローナル抗体またはフラグメントが、アミノ酸配列 GQPAGPDNKENC PVP GK PGEAVAARKLFPQ (SEQ ID NO: 1) を有するペプチドに結合することが可能である、請求項 1 または 2 に記載のモノクローナル抗体またはフラグメント。

【請求項 4】

第一のキャリアタンパク質に連結したアミノ酸配列 GQPAGPDNKENC PVP GK PGEAVAARKLFPQ (SEQ ID NO: 1) を有するペプチドを含む第一のペプチドコンジュゲート、または前記第一のキャリアタンパク質とは異なる第二のキャリアタンパク質に連結したアミノ酸配列 GQPAGPDNKENC PVP GK PGEAVAARKLFPQ (SEQ ID NO: 1) を有する前記ペプチドを含む第二のペプチドコンジュゲートにより非ヒト動物を免疫化すること ;

前記第一のペプチドコンジュゲートまたは前記第二のペプチドコンジュゲートに関する血中力価を有する前記非ヒト動物から、脾細胞を単離すること ;

前記脾細胞を黒色腫と融合させることにより、ハイブリドーマを形成させること ;

前記第一のペプチドコンジュゲートでの免疫化により得られたハイブリドーマからの上清を、前記第二のペプチドコンジュゲートへの力価についてスクリーニングすること、および前記第二のペプチドコンジュゲートでの前記免疫化により得られたハイブリドーマからの上清を、前記第一のペプチドコンジュゲートへの力価についてスクリーニングすること ;

前記第一のペプチドコンジュゲートに、前記第二のペプチドコンジュゲートに、そしてヒト組換え TK 1 に結合することが可能なモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマを選択すること ; ならびに

前記選択されたハイブリドーマの上清から前記モノクローナル抗体を単離すること、

10

20

30

40

50

を含む工程により得ることができる、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項 に記載のモノクローナル抗体またはフラグメント。

【請求項 5】

単離された身体試料中の細胞および/または血清 T K 1 のレベルを測定する方法であって、

前記単離された身体試料を、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項 に記載のモノクローナル抗体またはフラグメントと接触させること；および

結合されたモノクローナル抗体またはフラグメントの量を検出すること、を含む、方法。

【請求項 6】

単離された身体試料中の細胞および/または血清 T K 1 のレベルを測定するキットであって、

固体担体に固定された、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項 に記載の第一のモノクローナル抗体と；

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項 に記載の第二のモノクローナル抗体と、を含み、

前記第一のモノクローナル抗体が、

i) ヒト T K 1 の G E A V A A R K L F (S E Q I D N O : 2) ;

i i) 前記ヒト T K 1 のコンホメーション依存エピトープ；ならびに、

i i i) 前記ヒト T K 1 の N C P V P G K P G E (S E Q I D N O : 4) 、 P V P G K P G E A V (S E Q I D N O : 5) および N C P V P G K P G E A V (S E Q I D N O : 3) のうちの少なくとも1つ、

からなる群から選択される第一のエピトープへの特異性を有し、

前記第二のモノクローナル抗体が、前記群から選択される第二の異なるエピトープへの特異性を有する、キット。

【請求項 7】

前記キットがサンドイッチアッセイキットである、請求項 6 に記載のキット。

【請求項 8】

前記キットが酵素結合免疫吸着法 (E L I S A) キットである、請求項 6 または 7 に記載のキット。

【請求項 9】

前記第二のモノクローナル抗体が、共有結合により付着されたビオチンまたは共有結合により付着されたストレプトアビジンもしくはアビジンを有する、請求項 8 に記載のキット。

【請求項 10】

西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) で標識されたストレプトアビジンもしくはアビジン、または H R P 標識ビオチンと；

3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン (T M B) 基質、3 , 3 ' - ジアミノベンジジン (D A B) 基質および 2 , 2 ' - アジノ - ビス (3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸 (A B T S) 基質からなる群から選択される H R P 基質と、をさらに含む、請求項 9 に記載のキット。

【請求項 11】

前記固体担体としてマイクロタイタープレートをさらに含む、請求項 6 ~ 10 のいずれか 1 項 に記載のキット。

【請求項 12】

前記固体担体としてアガロースビーズまたは磁気ビーズをさらに含む、請求項 6 ~ 10 のいずれか 1 項 に記載のキット。

【請求項 13】

前記第一のモノクローナル抗体が、前記ヒト T K 1 の G E A V A A R K L F (S E Q I D N O : 2) および前記ヒト T K 1 の前記コンホメーション依存エピトープのうちの

10

20

30

40

50

一方から選択される前記第一のエピトープへの特異性を有し、

前記第二のモノクローナル抗体が、前記ヒトTK1のGEAVARKLF(SEQ ID NO: 2)および前記ヒトTK1の前記コンホメーション依存エピトープのうちの他方から選択される前記第二のエピトープへの特異性を有する、請求項6～12のいずれか1項に記載のキット。

【請求項14】

対象における腫瘍の再発の可能性を決定する方法(医師の判断を除く)であって、請求項5に記載の方法または請求項6～13のいずれか1項に記載のキットを用いて、前記対象から単離された身体試料中の血清TK1のレベルを測定すること；および前記単離された身体試料中の血清TK1の前記レベルを、健常対象集団を代表する血清TK1のレベル、または前記対象で過去に測定された血清TK1のレベルと比較することにより対象における腫瘍の再発の可能性を決定すること、を含む、方法。

10

【請求項15】

対象における細胞増殖を測定する方法であって、請求項5に記載の方法または請求項6～13のいずれか1項に記載のキットを用いて、前記対象から単離された身体試料中の血清TK1のレベルを測定すること；および前記単離された身体試料中の血清TK1の前記レベルに基づいて、前記細胞増殖を測定すること、を含む、方法。

20

【請求項16】

悪性疾患に罹患した対象において増殖工程の応答を測定する方法であって、請求項5に記載の方法または請求項6～13のいずれか1項に記載のキットを用いて、前記対象から単離された身体試料の血清TK1のレベルを測定すること；および前記単離された身体試料の血清TK1の前記レベルに基づいて、前記増殖工程の応答を測定すること、を含む、方法。

【請求項17】

対象の炎症、感染、または腫瘍細胞増殖のレベルを測定する方法であって、請求項5に記載の方法または請求項6～13のいずれか1項に記載のキットを用いて、前記対象から単離された身体試料の血清TK1のレベルを測定すること；および前記単離された身体試料の血清TK1の前記レベルに基づいて、炎症、感染、または腫瘍細胞増殖の前記レベルを測定すること、を含む、方法。

30

【請求項18】

前記単離された身体試料が、細胞試料、組織試料、血液試料、血清試料、脳脊髄液試料、肋膜液試料、滑液試料、および腹腔液試料からなる群から選択される、前記請求項5、14～17のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

技術分野

本発明の実施形態は、一般に、モノクローナル抗TK1抗体、そのようなモノクローナル抗TK1抗体の使用を含むキットおよび方法に関する。

【背景技術】

【0002】

背景

チミジンキナーゼ1、TK1(ATP:チミジン5'-ホスホトランスフェラーゼ、EC2.7.1.21)は、DNA前駆体合成に参与する酵素である。TK1の形態は、悪性腫瘍のヒトおよび動物の血清中にも高レベルで存在する。それゆえ血清TK1活性の測

50

定は、複数の異なる悪性疾患で、しかし主に白血病およびリンパ腫の例で、モニタリングおよび診断目的で用いられてきた。

【0003】

さらに、TK1は、血中で測定され得る増殖マーカーに過ぎず、日常的検査室テストとして利用可能ならば、大きな臨床利益を提供する可能性がある[1~8]。

【0004】

血清TK1活性は、数十年間は放射性基質¹²⁵I-dUrd (PROLIFIGEN (登録商標) TK-REA, DiaSorin Inc)を用いて測定されてきたが、このラジオエンザイムアッセイは、限定的な使用を有し、悪性血液癌の場合のみで使用されてきた[1, 2, 6]。非放射測定TK1活性アッセイ(TK LIAISON (登録商標)アッセイ, DiaSorin Inc.)が、近年になり利用可能になった。これは、感受性のあるロバストなアッセイであり、特に治療のモニタリングおよび再発の予測のために、血液癌のヒトおよびイヌにおける臨床的に貴重な情報を提供してきた[8, 9]。

【0005】

過去15年間で、ヒトTK1への抗体が利用可能になり、異なる血液および固形腫瘍、乳癌[5, 10, 11]、ならびに複数の他の形態の固形および血液腫瘍[11, 12]において、TK1活性と対照的に、TK1タンパク質レベルの決定を可能にした。

【0006】

TK1タンパク質の測定は、主にTK1のC末端部分に対して生成された抗TK1抗体に基づくドットプロット手順に依存する[3, 5, 10~13]。抗体生成のこの方策を選択する主な理由は、C末端領域がTK1の細胞周期調節に関与するからである[14~16]。それは、有糸分裂の際にTK1の分解を開始するための認識配列を含み、これが抗体生成を可能にする露出された領域であると推定されてきた[3, 8, 13, 20, 23~25]。ドットプロットアッセイは、複数の試験での使用に成功してきたが[5, 10~13]、その大きな限界は、それが臨床実験を実践する場合の日常的方法でないということである。現在、市販される異なる抗TK1抗体調製物は6種よりも多く存在し、組換えおよび細胞TK1と反応するものが複数示された(www.acris-antibodies.com)。しかし、現在において、日常的臨床診療で血清TK1の抗体に基づくアッセイは存在しない。

【0007】

血清TK1のための感受性がありロバストなアッセイを確立することが困難な主な理由は、おそらく血中に存在するTK1の複雑で可変的な形態に関係するであろう。近年になり、ヒトおよびイヌTK1酵素の両方を用いて、TK1の組換え体、細胞および血清形態を特徴づける複数の試験が実施された[17]。TK1が複数のオリゴマー複合体に存在し、重要なこととしてこれらの複合体の1つのサブフラクションのみに酵素活性があることが見出された。これは、固形腫瘍疾患患者の血清TK1に特にあてはまる。オリゴマー化は、血中で起こるジスルフィド架橋の形成に関係すると思われるが、おそらく腫瘍細胞が分解してTK1が血流に輸送される場合にもそうなるであろう。還元剤での治療は、血清TK1複合体の一部の再構成に導くが[2, 17]、免疫アッセイ構築でのこれらの事実の結論はこれまでででない。血中TK1タンパク質の主要部分が酵素的に不活性であるという事実は、TK1酵素活性測定が固形腫瘍疾患の場合にはあまり効果的でないという説明になり得る[18]。したがって、臨床使用への十分な感受性を持って血清TK1を測定し得る日常的インビトロ診断手順を確立することが強く求められている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

概要

ヒトTK1の血清形態に結合することが可能なモノクローナル抗体またはフラグメントを提供することを目的とする。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 9 】

この目的および他の目的は、本明細書に開示される実施形態により満たされる。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 0 】

該実施形態の態様は、ヒトチミジンキナーゼ 1 (T K 1) の血清形態に結合することが可能なモノクローナル抗体またはモノクローナル抗体フラグメントに関する。該モノクローナル抗体またはフラグメントは、

ヒト T K 1 の G E A V A A R K L F (S E Q I D N O : 2) と ;

ヒト T K 1 の N C P V P G K P G E (S E Q I D N O : 4) 、 P V P G K P G E A V (S E Q I D N O : 5) および N C P V P G K P G E A V (S E Q I D N O : 3) のうちの少なくとも 1 つと ;

ヒト T K 1 のコンホメーション依存エピトープと、
からなる群から選択されるエピトープへの特異性を有する。

【 0 0 1 1 】

該実施形態の別の態様は、身体試料中の細胞および / または血清 T K 1 材料のレベルを測定する方法に関する。該方法は、身体試料を先に記載のモノクローナル抗体またはフラグメントと接触させることを含む。該方法は、結合されたモノクローナル抗体またはフラグメントの量を検出することも含む。

【 0 0 1 2 】

該実施形態のさらなる態様は、身体試料中の細胞および / または血清 T K 1 のレベルを測定するキットに関する。該キットは、固体担体に固定された、または固体担体に固定されることを意図した、先に記載の第一のモノクローナル抗体を含む。該キットは、先に記載された第二のモノクローナル抗体も含む。この態様において、第一のモノクローナル抗体は、

ヒト T K 1 の G E A V A A R K L F (S E Q I D N O : 2) と ;

ヒト T K 1 の N C P V P G K P G E (S E Q I D N O : 4) 、 P V P G K P G E A V (S E Q I D N O : 5) および N C P V P G K P G E A V (S E Q I D N O : 3) のうちの少なくとも 1 つと ;

ヒト T K 1 のコンホメーション依存エピトープと、
からなる群から選択される第一のエピトープへの特異性を有する。第二のモノクローナル抗体は、この群から選択される第二の異なるエピトープへの特異性を有する。

【 0 0 1 3 】

該実施形態のさらに別の態様は、対象における腫瘍の再発の可能性を推定する方法に関する。該方法は、先に記載された方法またはキットを用いて、対象の身体試料中の血清 T K 1 材料のレベルを測定することを含む。該方法はまた、身体試料中の血清 T K 1 材料のレベルを、健常対象集団を代表する血清 T K 1 材料のレベル、または対象で過去に測定された血清 T K 1 材料のレベルと比較することを含む。

【 0 0 1 4 】

該実施形態のさらなる態様は、対象における細胞増殖を測定する方法に関する。該方法は、先に記載された方法またはキットを用いて、該対象の身体試料中の血清 T K 1 材料のレベルを測定することを含む。該方法はまた、身体試料中の血清 T K 1 材料のレベルに基づいて、細胞増殖を測定することを含む。

【 0 0 1 5 】

該実施形態のさらに別の態様は、悪性疾患に罹患した対象において増殖工程の応答を測定する方法に関する。該方法は、先に記載された方法またはキットを用いて、対象の身体試料中の血清 T K 1 材料のレベルを測定することを含む。該方法はまた、身体試料中の血清 T K 1 材料のレベルに基づいて、増殖工程の応答を測定することを含む。

【 0 0 1 6 】

該実施形態のさらなる態様は、対象の炎症、感染、または腫瘍細胞増殖のレベルを測定する方法に関する。該方法は、先に記載された方法またはキットを用いて、対象の身体試

10

20

30

40

50

料中の血清TK1材料のレベルを測定することを含む。該方法はまた、身体試料中の血清TK1材料のレベルに基づいて、炎症、感染、または腫瘍細胞増殖のレベルを測定することを含む。

【0017】

該実施形態のさらに別の態様は、アミノ酸配列GEAVARKLF(SEQ ID NO:2)、NCPVPGKPGE(SEQ ID NO:4)、PVPGKPGEAV(SEQ ID NO:5)、またはNCPVPGKPGEAV(SEQ ID NO:3)からなる単離されたペプチドに関する。

【0018】

該実施形態のさらなる態様は、ヒトTK1の血清形態に結合することが可能なモノクローナル抗体を生成する方法に関する。該方法は、第一のキャリアタンパク質に連結したアミノ酸配列GQPAGPDNKENCVPVPGKPGEAVARKLFPQ(SEQ ID NO:1)を有するペプチドを含む第一のペプチドコンジュゲート、または第一のキャリアタンパク質とは異なる第二のキャリアタンパク質に連結したアミノ酸配列GQPAGPDNKENCVPVPGKPGEAVARKLFPQ(SEQ ID NO:1)を有する該ペプチドを含む第二のペプチドコンジュゲートで、非ヒト動物を免疫化することを含む。該方法はまた、第一のペプチドコンジュゲートまたは第二のペプチドコンジュゲートに関する血中力価を有する非ヒト動物から脾細胞を単離することを含む。該方法は、脾細胞を黒色腫と融合させることによりハイブリドーマを形成させることをさらに含む。該方法は、追加として、第二のペプチドコンジュゲートへの力価について、第一のペプチドコンジュゲートでの免疫化から得られたハイブリドーマからの上清をスクリーニングすること、および第一のペプチドコンジュゲートへの力価について、第二のペプチドコンジュゲートでの免疫化から得られたハイブリドーマからの上清をスクリーニングすること、を含む。該方法は、第一のペプチドコンジュゲートに、第二のペプチドコンジュゲートに、そしてヒトrTK1に結合することが可能なモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマを選択することをさらに含む。該方法は、追加として、選択されたハイブリドーマの上清からモノクローナル抗体を単離することを含む。

【0019】

該実施形態のモノクローナル抗体およびフラグメントは、ヒトTK1の血清形態に結合することが可能なことに関して優れた特性を有し、それゆえ、試料中のヒトTK1の血清形態のレベルを測定することを含む様々なキットおよび方法で用いられ得る。

【0020】

該実施形態を、さらなる目的およびその利点と一緒に、以下の説明を添付の図面と共に参照することにより最良に理解することができる。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】抗XPA210ペプチドハイブリドーマからの上清と、組換えTK1調製物と、健常者および癌患者からの血清と、を用いたドットプロットアッセイの結果を示す。骨髓異形成症候群(MDS)は、血液細胞の骨髓分類の非効果的生成を含む様々な血液学的医療状態の集成的分類であり、前白血病としても公知である。CA-125は、この例において、卵巣癌に罹患した疑いのある患者を示す。

【図2】U.ウレアリチカム/パルバム(U.ureolyticum/pavreum)(現在の命名法)およびヒトTK1の配列類似性および3D構造に基づく四量体複合体のTK1のC末端領域に関する構造モデルを示す[19、20]。Aと標識された領域は、アミノ酸195~207を表す。Bと標識された領域は、アミノ酸208~216を表し、おそらく屈曲した領域を含んでいる。Cと標識された領域、即ちアミノ酸215~222は、該タンパク質の端部近くに予測されたC末端ヘリックスを含む。A、BおよびC領域は、酵素複合体の表面に向かって露出している可能性があり、抗体生成に適した抗原部位になり得る。

【図3】サンドイッチELISAアッセイの設計実施形態の略図である。

10

20

30

40

50

【図4】TK LIAISON（登録商標）アッセイ（DiaSorin Inc.）で測定された、健常な血液ドナー10名および前立腺癌と診断された患者28名の血清に関するTK活性値を示す。

【図5】XPA210-Ar1およびXPA210-Ar2抗体に基づいてサンドイッチELISAアッセイで測定された、健常な血液ドナー10名および前立腺癌と診断された患者28名の血清に関する吸光度値を示す。

【図6A-6D】ハイブリドーマ細胞を生成するXPA210-Ar1（図6B）、XPA210-Ar2（図6C）およびXPA210-Ar3（図6D）の総RNAのアガロースゲル電気泳動を示す。図6Aは、図6B~6DのレーンMにもあるDNAマーカーMarker IIIを示し、そのうちレーンRは、各ハイブリドーマ細胞の総RNAを示す。

10

【図7A-7C】ハイブリドーマ細胞を生成するXPA210-Ar1（図7A）、XPA210-Ar2（図7B）およびXPA210-Ar3（図7C）のPCR産物のアガロースゲル電気泳動を示す。レーンM：DNAマーカーMarker III、レーン1：VH、およびレーン2：VL。

【図8A】組換えヒトTK1とXPA210-Ar1（図8A）、およびXPA210-Ar2（図8B）との相互作用のAttana2000測定の結果を示す。1：1結合モデルを用いて曲線フィッティングを実施し、計算した定数は結合速度（ K_a ）、解離速度（ K_d ）、親和性（KD）、質量拡散速度（ k_t ）および最大シグナル（Bmax）である。

20

【図8B】組換えヒトTK1とXPA210-Ar1（図8A）、およびXPA210-Ar2（図8B）との相互作用のAttana2000測定の結果を示す。1：1結合モデルを用いて曲線フィッティングを実施し、計算した定数は結合速度（ K_a ）、解離速度（ K_d ）、親和性（KD）、質量拡散速度（ k_t ）および最大シグナル（Bmax）である。

【発明を実施するための形態】

【0022】

詳細な説明

本発明の実施形態は、一般に、モノクローナル抗チミジンキナーゼ1（抗TK1）抗体または抗体フラグメント、およびそのようなモノクローナル抗TK1抗体または抗体フラグメントの使用を含む方法およびキットに関する。

30

【0023】

該実施形態のモノクローナル抗TK1抗体およびフラグメントは、これらのモノクローナル抗TK1抗体およびフラグメントがヒトTK1の血清形態に結合することが可能であるため、診断および臨床ツールとして非常に有用である。

【0024】

当該技術分野で公知のモノクローナル抗TK1抗体がある。これらの抗体は、ヒト組換えTK1（rTK1）に、そして様々な度合いで、サイトゾルTK1とも呼ばれるヒトTK1の細胞形態に結合することが可能であるが、それらは、血清または血液試料などの身体試料中のヒトTK1の血清形態に結合し得ることに効率的でない。

40

【0025】

ヒトのTK1は、特定の分子の存在、例えばアデノシン三リン酸（ATP）の有無に応じて；タンパク質の濃度、即ち高濃度または低濃度に応じて；タンパク質の型、即ちネイティブまたは組換えTK1に応じて；そしてタンパク質の部位、即ち血清または細胞質に応じて、様々な形態で存在する。

【0026】

一般にサイトゾルおよび組換えヒトTK1は、ATPの存在下、または高濃度では四量体として生じ、ATPの非存在下または低濃度では二量体として生じる。サイトゾルおよび組換えヒトTK1の四量体形態は、高いTK1活性を有するが、二量体形態は、低いTK1活性を有する[26]。

50

【 0 0 2 7 】

ヒト血清TK1は、明らかに対照的に、オリゴマーなどの、またはそのようなオリゴマーを含む高分子量複合体の形態で、血清TK1活性を有し、二量体および四量体形態は、非常に低い血清TK1活性を有するか、または血清TK1活性が欠如している。

【 0 0 2 8 】

市販の抗TK1抗体(Abcamの3B3・E11; AbnovaのクローンF12であるM02; Abnovaのウサギモノクローナル抗体であるEPR3194およびEPR3193)は、血清TK1と十分に反応しない。これらの抗TK1抗体は、ヒト組換えTK1を基にして作製される。このことは、本明細書で提示される実験結果と合わせると、ヒト組換えTK1を基にしたモノクローナル抗TK1抗体の作製が一般に不十分であり、典型的には十分な結合強度でTK1の血清形態に結合することが可能な抗TK1抗体を生成しないことを示している。

10

【 0 0 2 9 】

さらに、TK1タンパク質の同じ部分に対して生じたモノクローナル抗TK1抗体は、本明細書で示されるTK1の血清形態に関して非常に異なる特異性および結合特性を有するであろう。このことは、TK1タンパク質の一部の第一のエピトープを認識するモノクローナル抗TK1抗体と、TK1タンパク質の同じ部分にある第二の異なるエピトープを認識する別のモノクローナル抗TK1抗体の両者が、TK1タンパク質の同じ一般的部分に対して生じたとしても、TK1タンパク質の一部の第一のエピトープを認識するモノクローナル抗TK1抗体はヒトTK1の血清形態に結合することが可能であるが、TK1タンパク質の同じ部分にある第二の異なるエピトープを認識する別のモノクローナル抗TK1抗体がTK1の血清形態に十分に結合しないことを意味している。

20

【 0 0 3 0 】

異なるモノクローナル抗TK1抗体の結合特性における多様性の説明を試みれば、おそらく、それがヒトTK1の血清形態に結合する能力を有することにおいて効率的であるヒトTK1内の特別なエピトープに特異性を有する唯一のモノクローナル抗TK1抗体ということであろう。本発明の実施形態は、ヒトTK1の血清形態に結合することが可能な所望の特性を備えたモノクローナル抗TK1抗体および抗体フラグメントの形成を可能にするそのような特別なエピトープを同定した。

【 0 0 3 1 】

それゆえ、本明細書に記載されたモノクローナル抗TK1抗体の特有の性質は、おそらく少なくとも一部がエピトープ結合特性によるものと思われる。

30

【 0 0 3 2 】

したがって該実施形態の一態様は、ヒトTK1の血清形態に結合することが可能なモノクローナル抗体またはモノクローナル抗体フラグメントに関する。該モノクローナル抗体またはフラグメントは、

- ・ヒトTK1のGEAVAAARKLFL(SEQ ID NO:2)と;
 - ・ヒトTK1のNCPVPGKPGE(SEQ ID NO:4)、PVPGKPGEAV(SEQ ID NO:5)およびNCPVPGKPGEAV(SEQ ID NO:3)のうちの少なくとも1つと;
 - ・ヒトTK1のコンホメーション依存エピトープと、
- からなる群から選択されるエピトープへの特異性を有する。

40

【 0 0 3 3 】

本明細書で提示される実験データは、先に提示された群のエピトープが、ヒトTK1の血清形態に結合することが可能なモノクローナル抗TK1抗体またはフラグメントを生成することに関係して、ヒトTK1における重要なエピトープであることを示している。

【 0 0 3 4 】

エピトープGEAVAAARKLFL(SEQ ID NO:2)は、ヒトTK1のアミノ酸213~222に対応する。このエピトープは、一般に本明細書では十量体または十量体ペプチドを表す。

50

【0035】

一方で、先に提示された群の第二のエピトープは、アミノ酸番号205～216に及ぶヒトTK1の部分に存在する3つの関連の配列を含む。これらの関連の配列は、本明細書では概してペプチド7と表されるNCPVPGKPGE(SEQ ID NO:4)、本明細書では概してペプチド8と表されるPVPGKPGEAV(SEQ ID NO:5)、および本明細書では概して十二量体または十二量体ペプチドと表されるNCPVPGKPGEAV(SEQ ID NO:3)である。

【0036】

これらのエピトープ(SEQ ID NO:2～5)は、ヒトTK1のC末端領域に存在する。TK1のこのC末端領域は、TK1の細胞周期調節に関与し、有糸分裂の際にTK1の分解を開始するための認識配列を含む。

10

【0037】

これらのエピトープは、ヒトTK1のC末端部分にあるより長い配列GQPAGPDNKENCVPVPGKPGEAVAARKLFA PQ(SEQ ID NO:1)の一部でもある。このより長い配列は、本明細書では概してXPA210、三十一量体、または三十一量体ペプチドと表される。

【0038】

先に提示された群の第三のエピトープは、ヒトTK1のコンホメーション依存エピトープである。このことは、該コンホメーション依存エピトープへの特異性を有するモノクローナル抗TK1抗体またはフラグメントが、ヒトTK1のいずれか1つ短い、即ち10～12アミノ酸長のペプチド部分への任意の異なる結合を示さないということを意味している。明らかに対照的なこととして、モノクローナル抗TK1抗体またはフラグメントの結合は、この場合、ヒトTK1の一次配列内では互いに隣接せず抗原ドメインの特定の三次元(3D)コンホメーションにより形成され得る複数の、即ち少なくとも2つの領域からなるエピトープまたは抗原ドメインに依存するコンホメーションであろう。したがって、ヒトTK1の3D構造において、これらの多重領域は、互いに隣接または接近して存在し、一緒になってコンホメーション依存エピトープを構成または形成しているのである。

20

【0039】

好ましい実施形態において、該コンホメーション依存エピトープは、ヒトTK1のC末端部分に存在するコンホメーション依存エピトープである。更に好ましい実施形態において、該コンホメーション依存エピトープは、アミノ酸番号195～アミノ酸番号225に及ぶヒトTK1のC末端部分、即ちXPA210に対応するヒトTK1の部分に存在するコンホメーション依存エピトープである。

30

【0040】

したがって3Dタンパク質構造を形成させるためのヒトTK1の一次アミノ酸配列のフォールディングが、C末端に、好ましくはC末端のXPA210に対応する部分に、多重領域を互いに接近してもたらずことで、これらの領域がヒトTK1の一次配列において互いに隣接しないとしても、コンホメーション依存エピトープの形成が可能になる。

【0041】

好ましい実施形態において、該実施形態のモノクローナル抗体またはフラグメントは、ヒトTK1の血清形態のみならず、ヒト組換えTK1(rTK1)にも結合することが可能である。

40

【0042】

好ましい実施形態において、該実施形態のモノクローナル抗体またはフラグメントは、ヒトTK1の血清形態のみならずヒトTK1の細胞形態、即ちサイトゾルTK1にも結合することが可能である。

【0043】

好ましい実施形態において、該実施形態のモノクローナル抗体またはフラグメントは、ヒトTK1の血清形態のみならず、ヒトrTK1およびヒトTK1の細胞形態にも結合することが可能である。

50

【0044】

こうして、該実施形態のモノクローナル抗体およびフラグメントは、TK1の異なる形態、即ち好ましくはヒトTK1の血清および細胞形態ならびにヒトrTK1に結合し得るため、非常に多方面での使用を有する。モノクローナル抗体およびフラグメントのこれらの結合特性は、モノクローナル抗体およびフラグメントが特異性を有する選択されたエピトープの同定によるものと考えられる。ヒトTK1のC末端部分に結合する他のモノクローナル抗TK1抗体は、ヒトrTK1および/またはヒトTK1の細胞形態に結合し得るかもしれないが、ヒトTK1の血清形態に十分に結合しない。これは、本発明のモノクローナル抗体またはフラグメントに特有の性質である。

【0045】

モノクローナル抗体またはフラグメントは、好ましくはアミノ酸配列GQPAGPDNKENCVPVPGKPGEA VAARKLFAPQ (SEQ ID NO: 1) を有するペプチド、即ちXPA210にも結合することが可能である。

【0046】

該実施形態のモノクローナル抗体またはフラグメントは、好ましくは以下のステップを含む工程により得るなど、ある工程により得ることができる。

【0047】

第一のキャリアタンパク質、好ましくはウシ血清アルブミン(BSA)に連結したアミノ酸配列GQPAGPDNKENCVPVPGKPGEA VAARKLFAPQ (SEQ ID NO: 1) を有するペプチドを含む第一のペプチドコンジュゲート、または第一のキャリアタンパク質とは異なる第二のキャリアタンパク質、好ましくはキーホールリンペットシアニン(KLH)に連結したアミノ酸配列GQPAGPDNKENCVPVPGKPGEA VAARKLFAPQ (SEQ ID NO: 1) を有するペプチドを含む第二のペプチドコンジュゲートにより非ヒト動物を免疫化するステップ。

【0048】

該非ヒト動物は、非限定的にマウス、ラット、ニワトリ、ヤギ、ヒツジ、モルモット、ハムスター、ウサギおよびウマをはじめとする抗体生成に伝統的に用いられる様々な動物から選択され得る。特定の実施形態において、非ヒト動物は、非ヒト哺乳動物である。

【0049】

脾細胞が、第一のペプチドコンジュゲートまたは第二のペプチドコンジュゲートに関する血中力価(抗体力価)を有する非ヒト動物から単離される。

【0050】

一般に複数の非ヒト動物が、第一のペプチドコンジュゲートまたは第二のペプチドコンジュゲートにより免疫化される。そのような例では、第一のペプチドコンジュゲートまたは第二のペプチドコンジュゲートに関して高い血中力価を示すこれらの非ヒト動物が同定される。脾細胞は、その後、これらの同定された非ヒト動物から単離される。

【0051】

血中力価を示す非ヒト動物は、該非ヒト動物の血液または血清が第一のペプチドコンジュゲートまたは第二のペプチドコンジュゲートに結合する、より好ましくは第一および第二のペプチドコンジュゲートのペプチドGQPAGPDNKENCVPVPGKPGEA VAARKLFAPQ (SEQ ID NO: 1) に結合する抗体を含むことを示唆している。

【0052】

その後、単離された脾細胞を当該技術分野で周知の技術に従って黒色腫と融合させることにより、ハイブリドーマが形成される。

【0053】

第一のペプチドコンジュゲートでの免疫化により得られたハイブリドーマからの上清を、第二のペプチドコンジュゲートへの力価(抗体力価)についてスクリーニングする。それ相応に、第二のペプチドコンジュゲートでの免疫化により得られたハイブリドーマからの上清を、第一のペプチドコンジュゲートへの力価(抗体力価)についてスクリーニング

10

20

30

40

50

する。

【0054】

このスクリーニングは、各免疫化で用いられたBSAまたはKLHなどのキャリアタンパク質に対して生成される抗体を回避するために実施される。

【0055】

その後、第一のペプチドコンジュゲートに、そして第二のペプチドコンジュゲートに結合することが可能なモノクローナル抗体を生成する1つまたは複数のハイブリドーマが、選択される。特定の実施形態において、第一のペプチドコンジュゲートに、第二のペプチドコンジュゲートに、そしてヒトrTK1に結合することが可能なモノクローナル抗体を生成する少なくとも1つのハイブリドーマが選択される。

10

【0056】

その後、該実施形態のモノクローナル抗体が、選択されたハイブリドーマの上清から単離される。

【0057】

一実施形態において、該モノクローナル抗体またはフラグメントは、

・DYEMH(SEQ ID NO:6)、またはSEQ ID NO:6への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；

・AIHPGYGGTAYNQKFKG(SEQ ID NO:7)、またはSEQ ID NO:7への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；

20

・FITKFDY(SEQ ID NO:8)、またはSEQ ID NO:8への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；

・KSSQSLLDSDGKTF LN(SEQ ID NO:9)、またはSEQ ID NO:9への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；

・LVSKLDS(SEQ ID NO:10)、またはSEQ ID NO:10への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；および

30

・WQGTHFPWT(SEQ ID NO:11)、またはSEQ ID NO:11への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列、

からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する相補性決定領域(CDR)を有する。

【0058】

特定の実施形態において、該モノクローナル抗体またはフラグメントは、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10およびSEQ ID NO:11からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するCDRを有する。

【0059】

特定の実施形態において、該モノクローナル抗体またはフラグメントは、アミノ酸配列SEQ ID NO:6またはSEQ ID NO:6への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する可変重鎖(VH)CDR1；アミノ酸配列SEQ ID NO:7またはSEQ ID NO:7への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVH CDR2；およびアミノ酸配列SEQ ID NO:8またはSEQ ID NO:8への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVH CDR3を有する。該モノクローナル抗体またはフラグメントは、好ましくは、同じくまたはあるいはアミノ酸配列SEQ ID NO:9またはSEQ ID NO:9への少なくとも90%の配列同一性、好ま

40

50

しくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する可変軽鎖(VL)CDR1;アミノ酸配列SEQ ID NO:10またはSEQ ID NO:10への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVL CDR2;およびアミノ酸配列SEQ ID NO:11またはSEQ ID NO:11への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVL CDR3を有する。

【0060】

特定の実施形態において、該モノクローナル抗体またはフラグメントは、アミノ酸配列SEQ ID NO:6を有するVH CDR1、アミノ酸配列SEQ ID NO:7を有するVH CDR2、アミノ酸配列SEQ ID NO:8を有するVH CDR3、アミノ酸配列SEQ ID NO:9を有するVL CDR1、アミノ酸配列SEQ ID NO:10を有するVL CDR2、およびアミノ酸配列SEQ ID NO:11を有するVL CDR3を有する。

10

【0061】

この特定の実施形態によるモノクローナル抗体は、本明細書ではXPA210-Ar1と表される。

【0062】

別の実施形態において、該モノクローナル抗体またはフラグメントは、

- ・DYEMH(SEQ ID NO:6)、またはSEQ ID NO:6への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列;

20

- ・AILPGSGGTAYNQKFKG(SEQ ID NO:12)、またはSEQ ID NO:12への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列;

- ・LITTFDY(SEQ ID NO:13)、またはSEQ ID NO:13への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列;

- ・KSSQSLLDSDGKTYLN(SEQ ID NO:14)、またはSEQ ID NO:14への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列;

30

- ・LVSKLDS(SEQ ID NO:10)、またはSEQ ID NO:10への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列;および

- ・WQGTHFPWT(SEQ ID NO:11)、またはSEQ ID NO:11への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列、

からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するCDRを有する。

【0063】

特定の実施形態において、該モノクローナル抗体またはフラグメントは、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:10およびSEQ ID NO:11からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するCDRを有する。

40

【0064】

特定の実施形態において、該モノクローナル抗体またはフラグメントは、アミノ酸配列SEQ ID NO:6またはSEQ ID NO:6への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVH CDR1;アミノ酸配列SEQ ID NO:12またはSEQ ID NO:12への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVH CDR2;およびアミノ酸配列SEQ ID NO:13またはSEQ ID NO:13への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%

50

の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVH CDR3を有する。該モノクローナル抗体またはフラグメントは、好ましくは、同じくまたはあるいはアミノ酸配列SEQ ID NO:14またはSEQ ID NO:14への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVL CDR1；アミノ酸配列SEQ ID NO:10またはSEQ ID NO:10への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVL CDR2；およびアミノ酸配列SEQ ID NO:11またはSEQ ID NO:11への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVL CDR3を有する。

【0065】

10

特定の実施形態において、該モノクローナル抗体またはフラグメントは、アミノ酸配列SEQ ID NO:6を有するVH CDR1、アミノ酸配列SEQ ID NO:12を有するVH CDR2、アミノ酸配列SEQ ID NO:13を有するVH CDR3、アミノ酸配列SEQ ID NO:14を有するVL CDR1、アミノ酸配列SEQ ID NO:10を有するVL CDR2、およびアミノ酸配列SEQ ID NO:11を有するVL CDR3を有する。

【0066】

この特定の実施形態によるモノクローナル抗体は、本明細書ではXPA210-Ar2と表される。

【0067】

20

さらなる実施形態において、該モノクローナル抗体またはフラグメントは、

- ・SGYSWH (SEQ ID NO:15)、またはSEQ ID NO:15への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；
- ・YIHYSGSTTYNPSLKG (SEQ ID NO:16)、またはSEQ ID NO:16への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；
- ・WGTGHWYFDV (SEQ ID NO:17)、またはSEQ ID NO:17への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；
- ・RSSTGAVTTTNYAN (SEQ ID NO:18)、またはSEQ ID NO:18への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；
- ・GTNNRVP (SEQ ID NO:19)、またはSEQ ID NO:19への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列；および
- ・ALWYSNHV (SEQ ID NO:20)、またはSEQ ID NO:20への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列、

からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するCDRを有する。

30

40

【0068】

特定の実施形態において、該モノクローナル抗体またはフラグメントは、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19およびSEQ ID NO:20からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するCDRを有する。

【0069】

特定の実施形態において、該モノクローナル抗体またはフラグメントは、アミノ酸配列SEQ ID NO:15またはSEQ ID NO:15への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVH CDR1；アミノ酸配列SEQ ID NO:16またはSEQ ID NO:16への

50

少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVH CDR2；およびアミノ酸配列SEQ ID NO：17またはSEQ ID NO：17への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVH CDR3を有する。該モノクローナル抗体またはフラグメントは、好ましくは、同じくまたはあるいはアミノ酸配列SEQ ID NO：18またはSEQ ID NO：18への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVL CDR1；アミノ酸配列SEQ ID NO：19またはSEQ ID NO：19への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVL CDR2；およびアミノ酸配列SEQ ID NO：20またはSEQ ID NO：20への少なくとも90%の配列同一性、好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVL CDR3を有する。

10

【0070】

特定の実施形態において、該モノクローナル抗体またはフラグメントは、アミノ酸配列SEQ ID NO：15を有するVH CDR1、アミノ酸配列SEQ ID NO：16を有するVH CDR2、アミノ酸配列SEQ ID NO：17を有するVH CDR3、アミノ酸配列SEQ ID NO：18を有するVL CDR1、アミノ酸配列SEQ ID NO：19を有するVL CDR2、およびアミノ酸配列SEQ ID NO：20を有するVL CDR3を有する。

【0071】

この特定の実施形態によるモノクローナル抗体は、本明細書ではXPA210-Ar3と表される。

20

【0072】

該実施形態の該モノクローナル抗体のフラグメントは、ヒトTK1の血清形態に結合することが可能なモノクローナル抗体の任意のフラグメントであり得、一本鎖抗体、Fvフラグメント、scFvフラグメント、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fab'フラグメント、Fdフラグメント、単ドメイン抗体(sdAb)、scFv-Fcフラグメント、di-scFvフラグメント、およびCDR領域からなる群から選択され得る。

【0073】

該実施形態の該モノクローナル抗体またはフラグメントは、好ましくは先に記載されたハイブリドーマの上清から単離されるなど、単離されたモノクローナル抗体またはフラグメントである。

30

【0074】

該モノクローナル抗体は、ヒトTK1の血清形態に結合することが可能なヒト化モノクローナル抗体またはキメラモノクローナル抗体であり得る。

【0075】

モノクローナル抗体の特異性は、親和性および/または結合活性に基づいて測定され得る。抗原とモノクローナル抗体の解離のための平衡定数(K_d)により表される親和性は、抗原決定基とモノクローナル抗体の抗原結合部位との結合強度の尺度である。 K_d の値が小さい程、抗原決定基とモノクローナル抗体との結合強度が強い。あるいは該親和性は、親和性定数(K_a)として表すこともでき、これは $1/K_d$ である。当業者には明白な通り、親和性は、該当する特異的抗原に応じて、それ自体が公知の手法で決定することができる。

40

【0076】

結合活性とは、モノクローナル抗体と関連の抗原との結合強度の尺度である。結合活性は、抗原決定基とモノクローナル抗体上の抗原結合部位との親和性、およびモノクローナル抗体上に存在する関連の結合部位の数の両方に関係する。

【0077】

典型的にはモノクローナル抗体は、 $10^{-5} \sim 10^{-12}$ モル/リットル(M)以下、

50

好ましくは $10^{-7} \sim 10^{-12}$ M 以下、より好ましくは $10^{-8} \sim 10^{-12}$ M の解離定数 (K_d) で、即ち $10^5 \sim 10^{12}$ M⁻¹ 以上、好ましくは $10^7 \sim 10^{12}$ M⁻¹ 以上、より好ましくは $10^8 \sim 10^{12}$ M⁻¹ の解離定数 (K_a) で、抗原に結合するであろう。

【0078】

一般に 10^{-4} M 超の任意の K_d 値 (または 10^4 M⁻¹ 未満の任意の K_a 値) が、一般に非特異的結合を示すと見なされる。

【0079】

好ましくは該実施形態の該モノクローナル抗体またはフラグメントは、500 nM 未満、好ましくは 200 nM 未満、より好ましくは 10 nM 未満、例えば 5 nM 未満の親和性でヒト TK1 の血清形態および/または組換え形態に結合するであろう。本明細書で提示される予備結合試験から、該実施形態の該モノクローナル抗体が、組換えヒト TK1 への結合に関して 5 nM 未満の K_D 値、一部ではさらに 1 nM 未満の K_D 値に対応する親和性を有することが示される。

10

【0080】

抗原または抗原決定基へのモノクローナル抗体の特異的結合は、例えばスキャッチャード分析、ならびに/またはラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素免疫測定法 (EIA) およびサンドイッチ競合アッセイなどの競合結合アッセイをはじめとするそれ自体が公知の任意の適切な手法、ならびに当該技術分野でそれ自体が公知のそれらの異なる変法で測定され得る。

20

【0081】

該実施形態の別の態様は、身体試料中の細胞および/または血清 TK1 材料のレベルを測定する方法に関する。該方法は、該身体試料を、該実施形態によるモノクローナル抗体またはフラグメントと接触させることを含む。該方法はまた、結合されたモノクローナル抗体またはフラグメントの量を検出することを含む。

【0082】

結合されたモノクローナル抗体またはフラグメントの量を検出するための任意の先行技術の技法を、本発明の方法で用いることができる。例えば該検出は、直接的でも間接的にもよく、蛍光または発色シグナルを発生してもよい。直接的検出は、典型的には標識にコンジュゲートされたモノクローナル抗体またはフラグメントの使用を含む。間接的検出は、モノクローナル抗体またはフラグメントの宿主の種に対して生じた標識二次抗体を使用する。

30

【0083】

エピトープへの抗体結合の視覚化のために一般に用いられる標識としては、フルオロフォア、および可溶性基質を発色性最終生成物に変換する酵素が挙げられる。

【0084】

身体試料は、好ましくは細胞試料、組織試料、血液試料、血清試料、脳脊髄液試料、肋膜液試料、滑液試料、および腹腔液試料からなる群から選択される。好ましい実施形態において、該身体試料は、体液試料であり、好ましくは血液試料、血清試料、脳脊髄液試料、肋膜液試料、滑液試料、および腹腔液試料からなる群から選択される。特定の実施形態において、該身体 (体液) 試料は、血液試料または血清試料である。

40

【0085】

したがって、該実施形態のモノクローナル抗体およびフラグメントは、身体試料中の細胞および/または血清 TK1 材料のレベル、即ち量を測定するために用いられ得る。該実施形態のモノクローナル抗体およびフラグメントは、潜在的にさらなるタンパク質、補因子または分子に結合されているなど、二量体、四量体、およびオリゴマーなどの様々な形態で細胞または血清 TK1 に結合することが可能であり、それによりそれらのレベルの測定が可能であると考えられる。したがってそれにより細胞および/または血清 TK1 材料は、様々な形態の細胞および/または血清 TK1 を包含する。

【0086】

50

特定の実施形態において、該方法は、身体試料中の血清 T K 1 材料のレベルを測定する方法である。

【 0 0 8 7 】

別の実施形態において、該方法は、身体試料中の細胞 T K 1 材料のレベルを測定する方法である。

【 0 0 8 8 】

さらなる実施形態において、該方法は、身体試料中の細胞 T K 1 材料および血清 T K 1 材料のレベルを測定する方法である。

【 0 0 8 9 】

該実施形態のさらなる態様は、身体試料中の細胞および/または血清 T K 1 材料のレベルを測定するキットに関する。該キットは、固体担体に固定された、または固体担体に固定されることを意図した、実施形態による第一のモノクローナル抗体を含む。該キットは、該実施形態による第二のモノクローナル抗体も含む。

10

【 0 0 9 0 】

該キットの第一のモノクローナル抗体は、ヒト T K 1 の G E A V A A R K L F (S E Q I D N O : 2) と ; ヒト T K 1 の N C P V P G K P G E (S E Q I D N O : 4) 、 P V P G K P G E A V (S E Q I D N O : 5) および N C P V P G K P G E A V (S E Q I D N O : 3) のうちの少なくとも1つと ; ヒト T K 1 のコンホメーション依存エピトープと、からなる群から選択される第一のエピトープへの特異性を有する。第二のモノクローナル抗体は、この群から選択される第二の異なるエピトープへの特異性を有する。

20

【 0 0 9 1 】

したがって該キットの2つのモノクローナル抗体は、両者ともヒト T K 1 の血清形態に結合することが可能で、好ましくはヒト T K 1 の細胞形態にも結合することが可能である。しかし、該キットの2つのモノクローナル抗体は、先に提示された群から選択される異なるエピトープへの特異性を有する。

【 0 0 9 2 】

一実施形態において、第一のモノクローナル抗体は、ヒト T K 1 の G E A V A A R K L F (S E Q I D N O : 2) およびヒト T K 1 のコンホメーション依存エピトープのうち的一方から選択される第一のエピトープへの特異性を有し、第二のモノクローナル抗体は、ヒト T K 1 の G E A V A A R K L F (S E Q I D N O : 2) およびヒト T K 1 のコンホメーション依存エピトープのうちの方から選択される第二のエピトープへの特異性を有する。

30

【 0 0 9 3 】

別の実施形態において、第一のモノクローナル抗体は、ヒト T K 1 の G E A V A A R K L F (S E Q I D N O : 2) と、ヒト T K 1 の N C P V P G K P G E (S E Q I D N O : 4) 、 P V P G K P G E A V (S E Q I D N O : 5) および N C P V P G K P G E A V (S E Q I D N O : 3) のうちの少なくとも1つと、の一方から選択される第一のエピトープへの特異性を有し、第二のモノクローナル抗体は、ヒト T K 1 の G E A V A A R K L F (S E Q I D N O : 2) と、ヒト T K 1 の N C P V P G K P G E (S E Q I D N O : 4) 、 P V P G K P G E A V (S E Q I D N O : 5) および N C P V P G K P G E A V (S E Q I D N O : 3) のうちの少なくとも1つと、の他方から選択される第二のエピトープへの特異性を有する。

40

【 0 0 9 4 】

さらなる実施形態において、第一のモノクローナル抗体は、ヒト T K 1 の N C P V P G K P G E (S E Q I D N O : 4) 、 P V P G K P G E A V (S E Q I D N O : 5) および N C P V P G K P G E A V (S E Q I D N O : 3) のうちの1つと、ヒト T K 1 のコンホメーション依存エピトープと、の一方から選択される第一のエピトープへの特異性を有し、第二のモノクローナル抗体は、ヒト T K 1 の N C P V P G K P G E (S E Q I D N O : 4) 、 P V P G K P G E A V (S E Q I D N O : 5) および N C P

50

V P G K P G E A V (S E Q I D N O : 3) のうちの1つと、ヒトTK1のコンホメーション依存エピトープと、の他方から選択される第二のエピトープへの特異性を有する。

【0095】

第一の特定の実施形態において、第一のモノクローナル抗体はX P A 2 1 0 - A r 1であり、第二のモノクローナル抗体はX P A 2 1 0 - A r 2である。第二の特定の実施形態において、第一のモノクローナル抗体はX P A 2 1 0 - A r 2であり、第二のモノクローナル抗体はX P A 2 1 0 - A r 1である。第三の特定の実施形態において、第一のモノクローナル抗体はX P A 2 1 0 - A r 1であり、第二のモノクローナル抗体はX P A 2 1 0 - A r 3である。第四の特定の実施形態において、第一のモノクローナル抗体はX P A 2 1 0 - A r 3であり、第二のモノクローナル抗体はX P A 2 1 0 - A r 1である。第五の特定の実施形態において、第一のモノクローナル抗体はX P A 2 1 0 - A r 2であり、第二のモノクローナル抗体はX P A 2 1 0 - A r 3である。第六の特定の実施形態において、第一のモノクローナル抗体はX P A 2 1 0 - A r 3であり、第二のモノクローナル抗体はX P A 2 1 0 - A r 2である。

10

【0096】

特定の実施形態において、該キットは、サンドイッチアッセイキットである。このことは、該キットが細胞および/または血清TK1材料の異なるエピトープに結合するモノクローナル抗体を使用し、それにより第一および第二のモノクローナル抗体の両方が、同じ細胞および/または血清TK1複合体または分子に同時に結合し得ることを意味する。

20

【0097】

特定の実施形態において、該キットは、酵素結合免疫吸着法(ELISA)キット、好ましくはサンドイッチELISAである。

【0098】

サンドイッチELISAを用いて、第一のモノクローナル抗体がいわゆる捕捉抗体として結合された固体担体の表面を調製することにより、身体試料中の細胞および/または血清TK1材料を検出することができる。好ましい実施形態において、既知量の第一のモノクローナル抗体が、固体担体の表面に結合されている。該表面の任意の非特異的結合部位が、場合により、しかし好ましくは遮断されている。身体試料が、その後、該表面に塗布され、それによりそこに存在する任意の細胞および/または血清TK1材料が、固定された第一のモノクローナル抗体によって捕捉される。非結合材料は、好ましくは1回または複数回の洗浄ステップにより除去される。その後、第二のモノクローナル抗体が添加されて、第一のモノクローナル抗体により捕捉された任意の細胞および/または血清TK1材料への結合が可能になる。

30

【0099】

結合された第二のモノクローナル抗体の量は、その後、直接的または間接的検出法で測定される。例えば標識または酵素を、第二のモノクローナル抗体に直接的に、またはビオチン-ストレプトアビジンもしくはビオチン-アビジンリンクなどのリンクを介して間接的に付着させることができる。あるいは、酵素に標識または結合されていて、第二のモノクローナル抗体に特異的に結合する二次抗体を使用することが可能である。

40

【0100】

こうして一実施形態において、第二のモノクローナル抗体は、共有結合で付着したビオチンを有する。あるいは第二のモノクローナル抗体は、共有結合で付着したストレプトアビジンまたはアビジンを有する。

【0101】

該キットは、好ましくは西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)で標識されたストレプトアビジンまたはHRP標識アビジンも含む。あるいは該キットは、HRP標識ビオチンを含む。該キットは、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン(TMB)基質、3, 3'-ジアミノベンジジン(DAB)基質または2, 2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸(ABTS)基質などのHRP基質も含む。そのよう

50

な場合、身体試料中の細胞および/または血清TK1材料のレベルは、HRPによる発色性基質から検出可能な有色生成物への変換を検出する分光光度法により決定され得る。

【0102】

一実施形態において、該キットは、第一のモノクローナル抗体が固定された、または固定されることを意図した固体担体として、マイクロタイタープレート(MCP)も含む。図3は、一実施形態による第一および第二のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAの概念の略図である。

【0103】

該キットは、必ずしもELISAキットである必要はない。別の実施形態において、該キットは、第一のモノクローナル抗体がカラム内のゲルマトリックスまたはビーズなどの固定相に結合したアフィニティークロマトグラフィーを用いる。例えば、該ゲルマトリックスまたはビーズは、SEPHAROSE(登録商標)などのアガロースで作製され得る。

10

【0104】

そのような場合、身体試料に存在する細胞および/または血清TK1材料は、固定された第一のモノクローナル抗体への結合を通してカラムに封入される。洗浄に続いて、結合された細胞および/または血清TK1材料は、溶出されて、第二のモノクローナル抗体を利用して検出され得る。例えば溶出された細胞および/または血清TK1材料の量は、ウェスタンブロットを利用し、そして直接的または間接的検出法を利用したTK1検出のために第二のモノクローナル抗体を用いて測定することができる。

20

【0105】

該固体担体は、代わりにDYNABEADS(登録商標)などの磁気ビーズであり得る。

【0106】

本発明の実施形態のキットは、身体試料中の細胞および/または血清TK1材料のレベルを測定するための、先に記載された方法で用いることができる。

【0107】

該実施形態のさらなる態様は、対象における腫瘍の再発の可能性を推定する方法に関する。該方法は、該実施形態による方法またはキットを用いて、対象からの身体試料中の血清TK1材料のレベルを測定することを含む。身体試料中の血清TK1材料のレベルは、その後、健常対象集団の代表する血清TK1材料のレベル、または対象において過去に測定された血清TK1材料のレベルと比較される。

30

【0108】

健常者の集団に関連するレベルよりも高い測定レベルは、対象において腫瘍再発の可能性が高いことを示している。同様に、過去の治療後の対象に関連するレベルよりも高い測定レベルは、対象において腫瘍再発の可能性が高いことを示している。TK1材料の測定レベルに基づく腫瘍再発の可能性を推定するより多くの情報については、[24、25]を参照されたい。

【0109】

該実施形態のさらに別の態様は、対象における細胞増殖を測定する方法に関する。該方法は、該実施形態による方法またはキットを用いて、対象からの身体試料中の血清TK1材料のレベルを測定することを含む。該方法はまた、身体試料中の血清TK1材料のレベルに基づいて細胞増殖を測定することを含む。

40

【0110】

特定の実施形態において、正常細胞または腫瘍細胞の増殖レベルが測定され、対象が正常もしくはベースライン細胞増殖を有するか、または上昇した細胞増殖を有するかを決定するために、血清TK1材料の測定レベルと比較される。

【0111】

本発明の方法は、対象に適用される様々な治療をモニタリングするツールとして使用することができる。例えば該方法を用いて、対象における抗増殖または抗腫瘍治療をモニタ

50

リングすることができる。そのような場合、該方法を用いて、選択された抗増殖または抗腫瘍治療が対象の細胞増殖を低減する上で所望の効果を有するかどうかを検証することができる。該治療が所望の効果を有さない、即ち細胞増殖における有意な減少が検出されない場合には、別の、または改良された抗増殖または抗腫瘍治療が、代わりに対象に適用され得る。

【0112】

該実施形態のさらなる態様は、悪性疾患に罹患した対象における増殖工程の応答を測定する方法に関する。該方法は、該実施形態による方法またはキットを用いて、対象からの身体試料中の血清TK1材料のレベルを測定することを含む。該方法はまた、身体試料中の血清TK1材料のレベルに基づいて増殖工程の応答を測定することを含む。そのような増殖工程の応答の例は、免疫反応または免疫反応の応答であり得る。一実施形態において、増殖工程の少なくとも1つの他のバイオマーカを、測定に用いることもできる。

10

【0113】

該実施形態のさらに別の態様は、対象の炎症、感染または腫瘍細胞増殖のレベルを測定する方法に関する。該方法は、該実施形態による方法またはキットを用いて、対象からの身体試料中の血清TK1材料のレベルを測定することを含む。該方法はまた、身体試料中の血清TK1材料のレベルに基づいて炎症、感染または腫瘍細胞増殖のレベルを測定することを含む。一実施形態において、炎症、感染または腫瘍細胞増殖の少なくとも1つの他のバイオマーカを、測定に用いることもできる。

20

【0114】

乳房腫瘍、肺腫瘍および膀胱腫瘍などの腫瘍細胞の増殖を、特に本発明の方法により測定およびモニタリングしてもよい。

【0115】

該実施形態によるモノクローナル抗体を用いる方法およびキットの先に記載された実施形態において、該対象は、好ましくはヒト対象であり、該身体試料は、好ましくは適切な身体試料のこれまでに記載された群から選択される。

【0116】

該実施形態のさらなる態様は、アミノ酸GEAVAARKLF(SEQ ID NO: 2)、NCPVPGKPGE(SEQ ID NO: 4)、PVPGKPGEAV(SEQ ID NO: 5)またはNCPVPGKPGEAV(SEQ ID NO: 3)からなる単離されたペプチドに関する。そのような単離されたペプチドは、抗体結合のためのエピトープとして非常に適している。該単離されたペプチドは、ヒトTK1の血清形態に、好ましくはヒト組換えTK1およびヒトTK1の細胞形態に結合することが可能なモノクローナル抗TK1抗体またはフラグメントを調製するために用いられてもよい。

30

【0117】

該実施形態のさらに別の態様は、ヒトTK1の血清形態に結合することが可能なモノクローナル抗体を生成する方法に関する。該方法は、第一のキャリアタンパク質に連結したアミノ酸配列GQPAGPDNKENCVPVPGKPGEAVAARKLFPQ(SEQ ID NO: 1)を有するペプチドを含む第一のペプチドコンジュゲート、または第一のキャリアタンパク質とは異なる第二のキャリアタンパク質に連結したアミノ酸配列GQPAGPDNKENCVPVPGKPGEAVAARKLFPQ(SEQ ID NO: 1)を有する該ペプチドを含む第二のペプチドコンジュゲートで、非ヒト動物を免疫化することを含む。該方法はまた、第一のペプチドコンジュゲートまたは第二のペプチドコンジュゲートに関する血中力価を有する非ヒト動物から脾細胞を単離することを含む。該方法は、脾細胞を黒色腫と融合させることによりハイブリドーマを形成することをさらに含む。該方法は、追加として、第二のペプチドコンジュゲートの力価について、第一のペプチドコンジュゲートでの免疫化から得られたハイブリドーマからの上清をスクリーニングすること、および第一のペプチドコンジュゲートの力価について、第二のペプチドコンジュゲートでの免疫化から得られたハイブリドーマからの上清をスクリーニングすること、を含む。該方法は、第一のペプチドコンジュゲートに、第二のペプチドコンジュゲート

40

50

に、そしてヒト rTK1 に結合することが可能なモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマを選択することをさらに含む。該方法は、追加として、選択されたハイブリドーマの上清からモノクローナル抗体を単離することを含む。

【0118】

一実施形態において、ハイブリドーマの選択は、第一のペプチドコンジュゲートに、第二のペプチドコンジュゲートに、ヒト rTK1 に、そして癌に罹患したヒト対象から得られた血清試料に存在する TK1 に結合することが可能なモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマを選択することを含む。

【0119】

一実施形態において、該方法は、癌に罹患したヒト対象から得られた血清試料に存在する TK1 に結合することが可能な単離されたモノクローナル抗体を選択することを含む。

10

【0120】

したがって好ましい実施形態において、該方法は、TK1 の血清形態に結合することが可能なモノクローナル抗体を得るための選択を含む。この選択は、ハイブリドーマを選択すること、または単離されたモノクローナル抗体の間で選択すること、のいずれかによって行われ得る。

【0121】

実施例

本発明の実施例は、3つの独特なモノクローナル抗TK1抗体の設計および多段階単離を示す。該モノクローナル抗TK1抗体は、組換えTK、細胞TK1および血清TK1を認識することが可能である。さらに、TK1アミノ酸配列内のエピトープ結合領域を含む特有のモノクローナル抗TK1抗体を得るための免疫化、選択および最終的スクリーニング手順を開示する。健常な血液ドナーの試料および異なる型の癌疾患の患者からの試料を用いたこれらのモノクローナル抗TK1抗体のうちの2つに基づくサンドイッチELISAの設計および実施も説明する。

20

【0122】

実施例1：ヒトTK1のC末端領域に対するマウスモノクローナル抗体の調製

ヒトTK1タンパク質配列[19]から開始して以下の配列GQPAGPDNKENC PVPGKPGEA VAAARKLFAPQ (SEQ ID NO: 1)を含むヒトTK1のC末端領域に対するマウスモノクローナル抗体の免疫化および選択を、2つの例で実施した。

30

【表1】

XPA 210	GQPAGPD---NKENC--PVPGKPGEA VAA---RKLFAPQ
ヒト	KKASGQPAGPD---NKENC--PVPGKPGEA VAA---RKLFAPQ QILQCS
マウス	KKSSAQTAGSD---NK-NC--LVLGQPGEALVV---RKLFASQ QVLYN
ラット	KKSSAQTA--D---NKENY--SVLGQPIEIPAV---RKLFAPQ QILQCN
ニワトリ	QKR PQQ-LGS---ENKENV--PMGVKQLDMPAS---RKIFAS
イヌ	KASGPPMGLDSRENKENVLVLVPGKPGEGKEATGVRKLFAPQHVLQCS

40

【0123】

先に提示された配列は、ヒトTK1のC末端 (SEQ ID NO: 21) と、マウス (SEQ ID NO: 22)、ラット (SEQ ID NO: 23)、ニワトリ (SEQ ID NO: 24) およびイヌ (SEQ ID NO: 25) における対応するヒトTK1配列で免疫化するために用いられた配列との比較を示している。

【0124】

最初のアプローチでは、等量のペプチドおよびキャリアタンパク質を用いた標準法によりグルタルアルデヒド (2.3%) で架橋することによりウシ血清アルブミン (BSA) に連結されたペプチドで、雌Balb/cマウスを免疫化した。マウスを最初、コンジュ

50

ゲート（フロイント完全アジュバント中）200 μgで免疫化し、3回の追加免疫（フロイント不完全アジュバント中にそれぞれ100 μg）の後、その抗原への血中力価が高いマウスから脾細胞を単離し、マウス黒色腫細胞株SP2/0と融合させた。得られたハイブリドーマを複数回のサブクロニングに供し、細胞を含むウェルからの上清を、ペプチド抗原（0.05 μg/ウェル、SEQ ID NO: 1）でコーティングされた96ウェルプレートを含むELISAアルカリホスファターゼ検出システム（Vector Laboratories、米国カリフォルニア州所在）を用いてスクリーニングした。陽性のウェルからの最高力価を有する上清を、さらに合計3～5回サブクロニングして、上清をテストした。最後に、三十一量体ペプチドおよびヒト組換えTK1への力価が高い7つの候補モノクローナルハイブリドーマクローンを同定した。細胞ストックを確定して、培養物を増殖させ、上清の多量のバッチを調製し、それを凍結乾燥してドットプロットアッセイおよびELISAアッセイでテストした。この手順から、本明細書でXPA210-Ar1と表されるモノクローナル抗体の単離ができた。

10

【0125】

C末端ペプチドへのモノクローナル抗体を得るための第二のアプローチでは、3つの異なる抗原を用いた：i)先に記載されたBSAに連結されたXPA210ペプチド（SEQ ID NO: 1）、ii)類似の架橋法によりキーホールリンペットシアニン（KLH）に連結されたXPA210ペプチド、およびiii)ヒトrTK1。rTK1の生成および構造特性は、[20]に記載されている。マウスを最初、フロイント完全アジュバント中のペプチドコンジュゲートまたはrTK1 100 μgで免疫化し、3回の追加免疫（フロイント不完全アジュバント中にそれぞれ100 μg）の後、その抗原への血中力価が高いマウスから脾細胞を単離し、マウス黒色腫細胞株SP2/0と融合させた。得られたハイブリドーマ上清を、1 μg/ウェル ペプチド抗原と共に本質的に先に記載された通りのシステムを用いてスクリーニングした。ペプチドBSAコンジュゲートでの免疫化から得られたハイブリドーマ上清を、ウェル中のペプチドKHLコンジュゲートでスクリーニングして、逆にペプチドKHL免疫化についても同様にスクリーニングした。このスクリーニングは、各免疫化で用いられるキャリアタンパク質に対する抗体生成を回避するように設計された。陽性のウェルの力価が最高の上清を、5回サブスクリーニングした。ペプチドコンジュゲートおよびヒトrTK1の両方が陽性のハイブリドーマのみを選択した。組換えTK1免疫化のみの場合、TK1タンパク質を選択に用いた。各例で、ペプチドコンジュゲートおよびrTK1への力価が高い10の候補モノクローナルハイブリドーマクローンを同定した。細胞ストックを確定し、培養物を増殖させて、上清の多量のバッチを調製して凍結乾燥し、以下に記載される複数のアッセイでテストした。

20

30

【0126】

サンドイッチELISA手順に適したモノクローナル抗体対を同定するために、複数の二次スクリーニング法を、以下の実施例に記載された通り利用した。

【0127】

実施例2：ドットプロット高感度ケミルミネッセンス（ECL）免疫検出

この手順を本質的に[21]に記載された通り実施した。要約すると、ペプチド3～5 μl（3～300 pg/スポット）、ヒトrTK1（0.02～0.2 ng/スポット）または血清試料を、ニトロセルロース膜に直接塗布した。膜を10%脱脂乳を含むトリス緩衝生理食塩水（TBS）中で4時間ブロックし、上清または他の一次抗TK1抗体を添加した後、室温（RT、23～25℃）で一晩インキュベートした。ビオチン化二次抗マウスIgG抗体と共にRTで1時間インキュベートした後、膜をアビジン-HRP-ストレプトアビジンを含むTBS緩衝液中でインキュベートし、その後、ECL基質（GE Healthcare）を添加した。膜上の単一スポットのケミルミネッセンス強度を、2～4分間暴露されたフィルム（GE Healthcare）上で検出した。複数の血清試料もまた、健常対照および異なる腫瘍疾患の患者の両方からの膜に塗布した。

40

【0128】

ペプチド抗原、rTK1、既知の高血清TK1レベルの腫瘍患者の血清、および最小限

50

に健常者からの血清と明白に反応したハイブリドーマのみを、更なるE L I S A開発のための高ランク候補物質とした。これらの結果の例を、抗体X P A 2 1 0 - A r 2およびX P A 2 1 0 - A r 3について図1に示している。

【0129】

実施例3：免疫親和性磁気ビーズアッセイ

該アッセイを、二段階で実施した。最初に、ドットプロットアッセイの結果（実施例2）に基づいて選択された抗X P A 2 1 0抗体を、ヒトr T K 1、または血清T K 1レベルの高い血液癌に罹患した患者の血清試料と反応させた。第二段階で、抗原抗体複合体に結合する磁気ビーズ含有抗マウスI g G抗体を添加し、次にその混合物が磁場に供し、反応溶液から取り出すことができた。非結合T K 1タンパク質を、酵素活性測定により検出した。

10

【0130】

異なる濃度（10ng、5ng）のヒトr T K 1および血液癌患者の血清30μlを、T B S T w e e n - 2 0（T B S T）+ 2% B S A 270μlで希釈して、精製モノクローナル抗T K 1抗体（リン酸緩衝生理食塩水（P B S）+ 0.1% B S A + 2mM エチレンジアミン四酢酸（E D T A）、pH7.4に溶解）4μgまたは選択されたハイブリドーマからの各上清50μlと混和した。その後、これらの試料を4℃で2時間、穏やかに攪拌し、続いて洗浄緩衝液（P B S + 0.1% B S A + 2mM E D T A、pH7.4）中の予備洗浄されたヒツジ抗マウス磁気（Dyna）ビーズ70μlを添加し、さらに1時間インキュベートした。その後、試料の試験管を磁気上に2分間置き、非結合材料20μlを除去して、T K 1活性を測定した。T K 1活性は、[22]に記載された改変³H-T h dアッセイで測定した。非結合画分の活性を、任意のハイブリドーマ上清と反応しない、ビーズで処理された対照試料と比較した。9つの選択されたハイブリドーマからの上清の結果を、表1に示す。

20

【0131】

選択された抗体のほとんどが、ヒトr T K 1と反応し、予測通りT K 1活性の大部分に結合したが、患者試料の血清T K 1との相互作用の場合、T K 1活性の多くが非結合のままであった（97~31%）。後者の結果に基づいて、5つの候補ハイブリドーマを選択し、増殖させて、より多量のI g Gを単離および精製した。これらの候補抗体を、その後、以下の実施例に記載されたアッセイでテストした。

30

【表2】

表1 抗体-ビーズに結合しなかったT K 1活性

	ヒトr T K 1 (10ng)	ヒトr T K 1 (5ng)	癌血清
X P A 2 1 0 - A r 1	66 %	52 %	31 %
X P A 2 1 0 - A r 6 4	26 %	23 %	32 %
S u p - 5 5 3	35 %	25 %	70 %
S u p - 1 6 8	82 %	64 %	86 %
S u p - 5 5 5	35 %	27 %	67 %
S u p - 1 3 9	47 %	30 %	97 %
S u p - 1 6 2	39 %	23 %	54 %
S u p - 5 8 3	31 %	21 %	58 %
S u p - 1 6 5	53 %	45 %	42 %

40

【0132】

実施例4：モノクローナル抗T K 1抗体候補を用いたエピトープマッピング分析

50

選択されたモノクローナル抗体が結合するアミノ酸領域を決定するために、ビオチン化された10のアミノ酸標的ペプチドを用いたPepsican分析を実施した。その手順は、実施例1に関連して示されたTK1配列の193~226の領域を表す14の十量体アミノ酸ペプチドの組み合わせの合成に基づいている。各ペプチドは、8つのアミノ酸オーバーラップおよび2つのアミノ酸ギャップを有し、それにより14の異なるペプチドの組み合わせが得られる(表2参照)。全長ペプチド全体も含まれており、これらのペプチド全てを、ストレプトアビジンをコーティングしたマイクロタイタープレートに固定した。1時間の吸着ステップの後、プレートをPBS、1%BSAおよび0.1%Tween20で洗浄した。その後、異なる抗体をおよそ5 μ g/mlで添加し、プレートを1時間インキュベートした後、3回洗浄した。その後、HRPコンジュゲートを添加して、1時間インキュベートした。その後、プレートを同じ緩衝液で6回洗浄した。最後に、100 μ l 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)基質を用いて吸光度を測定した(一連の抗体での1回のテスト結果を表2に示す)。

【表 3】

表 2 - 抗体を含むウェルの 415 nm の吸光度値

ペプチド	XPA210 -Ar1	Sup-5 53	Sup-1 65	Sup-2 119
ASGQPAGPDN (SEQ ID NO: 26)	0.113	0.067	0.057	0.063
GQPAGPDNKE (SEQ ID NO: 27)	0.108	0.061	0.057	0.057
PAGPDNKENC (SEQ ID NO: 28)	0.120	0.060	0.055	0.057
GPDNKENCVPV (SEQ ID NO: 29)	0.112	0.064	0.060	0.057
DNKENCVPVG (SEQ ID NO: 30)	0.108	0.059	0.059	0.058
KENCVPVGKP (SEQ ID NO: 31)	0.109	0.060	0.058	0.057
NCPVPGKPG (SEQ ID NO: 4)	0.114	0.062	1.988	0.058
PVPGKPGEAV (SEQ ID NO: 5)	0.115	0.063	1.838	0.057
PGKPGEAVAA (SEQ ID NO: 32)	0.112	0.071	0.059	0.058
KPGEAVAARK (SEQ ID NO: 33)	0.116	0.067	0.059	0.058
GEAVAARKLF (SEQ ID NO: 2)	3.507	0.065	0.057	0.058
AVAARKLFAP (SEQ ID NO: 34)	0.125	0.073	0.062	0.60
AARKLFAPQQ (SEQ ID NO: 35)	0.137	0.066	0.060	0.065
ARKLFAPQQI (SEQ ID NO: 36)	0.130	0.063	0.062	0.065
XPA210 (SEQ ID NO: 1)	3.842	3.780	0.136	0.070
	Sup-21 15	Sup-1 68	Sup-1 119	Sup-5 84
ASGQPAGPDN (SEQ ID NO: 26)	0.058	0.063	0.063	0.066
GQPAGPDNKE (SEQ ID NO: 27)	0.058	0.057	0.061	0.060
PAGPDNKENC (SEQ ID NO: 28)	0.058	0.058	0.062	0.059
GPDNKENCVPV (SEQ ID NO: 29)	0.059	0.061	0.062	0.060

10

20

30

40

DNKENCVPVG (SEQ ID NO: 30)	0.060	0.062	0.061	0.059
KENCVPVGKP (SEQ ID NO: 31)	0.061	0.061	0.063	0.058
NCPVPGKPGE (SEQ ID NO: 4)	0.062	1.235	0.061	0.059
PVPGKPGGEAV (SEQ ID NO: 5)	0.062	1.093	0.065	0.060
PGKPGGEAVAA (SEQ ID NO: 32)	0.062	0.065	0.064	0.062
KPGEAVAARK (SEQ ID NO: 33)	0.064	0.063	0.066	0.061
GEAVAARKLF (SEQ ID NO: 2)	0.062	0.067	0.064	0.470
AVAARKLFAP (SEQ ID NO: 34)	0.064	0.067	0.067	0.066
AARKLFAPQQ (SEQ ID NO: 35)	0.059	0.066	0.065	0.065
ARKLFAPQQI (SEQ ID NO: 36)	0.062	0.064	0.066	0.097
XPA210 (SEQ ID NO: 1)	0.075	0.129	2.978	3.756
	Sup-58 3	Sup-1 62		
ASGQPAGPDN (SEQ ID NO: 26)	0.060	0.067		
GQPAGPDNKE (SEQ ID NO: 27)	0.061	0.064		
PAGPDNKENC (SEQ ID NO: 28)	0.062	0.063		
GPDNKENCVP (SEQ ID NO: 29)	0.062	0.063		
DNKENCVPVG (SEQ ID NO: 30)	0.062	0.063		
KENCVPVGKP (SEQ ID NO: 31)	0.060	0.063		
NCPVPGKPGE (SEQ ID NO: 4)	0.060	0.064		
PVPGKPGGEAV (SEQ ID NO: 5)	0.060	0.067		
PGKPGGEAVAA (SEQ ID NO: 32)	0.061	0.067		
KPGEAVAARK (SEQ ID NO: 33)	0.062	0.072		
GEAVAARKLF (SEQ ID NO: 2)	0.276	0.072		
AVAARKLFAP	0.065	0.077		

10

20

30

40

(SEQ ID NO: 34)				
AARKLFAPQQ (SEQ ID NO: 35)	0.063	0.066		
ARKLFAPQQI (SEQ ID NO: 36)	0.063	0.063		
XPA210 (SEQ ID NO: 1)	3.606	3.788		

【0133】

表2の結果は、様々な抗体の結合に必要な最小アミノ酸配列の同定を可能にする。三十一量体ペプチド(XPA210)が抗原として用いられる場合には、先の手順により選択されたハイブリドーマを生成する抗体には3つの主な型が存在することが明らかと思われる。

10

【0134】

XPA210-Ar1、Sup-584およびSup-583により例示された1つの型は、領域:GEAVARKLF(SEQ ID NO:2)に結合し、したがってこれらのアミノ酸は、該抗原ドメイン内に含まれる。

【0135】

Sup-165(XPA210-Ar3)およびSup-168により例示される別のドメインは、おそらく抗原ドメインとしてアミノ酸NCPVPGKPG EAV(SEQ ID NO:3)を含むペプチド7(NCPVPGKPG EAV(SEQ ID NO:4))およびペプチド8(PVPGKPG EAV(SEQ ID NO:5))に結合する。これらの抗体は、三十一量体XPA210との反応性が最初の型よりも低いため、10アミノ酸ペプチドをより好むようである。

20

【0136】

最後に、14の十量体ペプチドのいずれかへの任意の異なる結合を示さなかったSup-553、Sup-1119およびSup-162(XPA210-Ar2)により例示された群がある。この結果から、それらの結合がコンホメーション依存性であり、一次配列内に隣接せず抗原ドメインの特定の3Dコンホメーションにより形成された複数の領域からなることが強く示唆される。

30

【0137】

さらに、この群および他の2つの群の抗体は、全て全長三十一量体ペプチド(XPA210)およびヒトrTK1と反応した。

【0138】

したがって、このデータから、モノクローナル抗体XPA210-Ar1が三十一量体(XPA210)のC末端部分のドメインを認識することが強く示される。二次配列の予測から、この領域がヘリックスを形成することが示唆される。不幸にも、TK1四量体のこの領域の直接的な構造データが存在せず、細菌ウレアプラズマ・ウレアリチカム/バルバムTK1構造[20]とヒトrTK1の間の配列および構造相同性に基づくモデルから、図2に示されたC末端構造が示唆される。XPA210領域全体は、おそらくターン領域(図2でBと標識)であり、C末端にヘリックスを有する(図2でCと標識)。エピトープマッピング結果の可能な解釈によれば、XPA210-Ar1様のエピトープがC末端ヘリックスに関係し、XPA210-Ar3エピトープがTK1の細胞周期分解のためのユビキチン化シグナル配列として働くKEN配列に非常に接近した屈曲ドメインに関係する、ということになる[15]。最後に、XPA210-Ar2エピトープは、コンホメーション依存性であり、三十一量体領域の3D構造全体の異なる領域により形成され得る。したがって、異なる結合特性を有するモノクローナル抗体が、適切なサンドイッチ免疫アッセイ対を形成する可能性がある。

40

【0139】

実施例5: サンドイッチELISAアッセイ

50

試料と相互作用する「キャッチャー」として働く、マイクロタイタープレート(MTP)のウェルに結合させた第一のモノクローナル抗TK1抗体を含むサンドイッチELISAアッセイの概要を、図3に示す。第二のモノクローナル抗TK1抗体を、第二のステップで添加して、試料中に存在してウェルに固定された第一のモノクローナル抗TK1抗体に結合させたTK1に、第二のモノクローナル抗TK1抗体を結合させる。第二のモノクローナル抗TK1抗体を、ビオチン化により修飾するが、それは、HRP標識ストレプトアビジンに関してレポータ複合体と非常に効率的に相互作用して、容易に測定可能な発色反応を生じ得ることを意味している。サンドイッチELISAアッセイの標準手順の概要を以下に表す：

1. バイアル中の等容量(70 μ l)の試料および試料希釈緩衝液をピペットで注入して、ボルテックス処理する；
2. 23~25 で30分間インキュベートする；
3. 試料と試料希釈緩衝液との混合物100 μ l/ウェルを添加する；
4. 25、650rpmで振とうしながら2時間インキュベートする；
5. PBS Tween-20(PBST)350 μ lで4回洗浄する；
6. 試薬緩衝液中のビオチン標識された抗TK1抗体100 μ l/ウェルを添加する；
7. 25、650rpmで振とうしながら1時間インキュベートする；
8. PBST 350 μ lで4回洗浄する；
9. ストレプトアビジン ポリ-HRP 100 μ l/ウェルを添加する；
10. 25、650rpmで振とうしながら30分間インキュベートする；
11. PBST 350 μ lで4回洗浄する；
12. TMB基質 100 μ l/ウェルを添加する；
13. 15分間インキュベートする；
14. 停止溶液 100 μ l/ウェルを添加する；
15. 450nmで吸光度を読み取る。

【0140】

最初のテストのセットアップで、モノクローナル抗体XPA210-Ar1を「キャッチャー」として選択し、ポリクローナル抗XPA210抗体をディテクターとしてニワトリの体内で生成させた[13、23]。このセットアップを用いて、サンドイッチELISAが図3に示された通り設計され得ることを検証した。その後、ポリクローナル抗XPA210抗体を、本明細書に開示された通り選択された第二のモノクローナル抗TK1抗体で置き換えた。

【0141】

第二のモノクローナル抗体を選択するための第一のアッセイにおいて、実施例4で得られた精製された新しい候補抗体を、キャッチャーとしてMTPウェルに吸着させて、XPA210-Ar1抗体を、ディテクターとして用いた。その結果から、癌患者の血清で陽性結果を与えた候補抗体の上清はSup-162(XPA210-Ar2)およびSup-165(XPA210-Ar3)の2つのみであったが、候補抗体の5つ全てが、三十一量体ペプチド(XPA210)コンジュゲートおよびヒトrTK1と反応したことが示された。最高の反応性は、XPA210-Ar2で観察され、この抗体の多量の調製物を生成してビオチン化し、ディテクター抗体として用いた。XPA210-Ar1は、XPA210 ELISAでのキャッチャー抗体として用いた(図3)。このアッセイおよび様々な臨床試料での最終結果を、図6に示す。

【0142】

実施例6：サンドイッチELISAアッセイの感受性および特異性

ここでは、XPA210-Ar1およびXPA-Ar2モノクローナル抗体を用いて実施例5に記載された通り実施されたプロトタイプのELISAで得られた結果を示す。テストされた試料は、異なる疾患ステージの前立腺がん患者からの血清28種であった(Biothema Incから購入)。参照法として、TK LIAISON(登録商標)活性アッセイを用い、結果を図4に示す。図5にはELISAアッセイの結果を示し、こ

の場合、直接の吸光度値を表す。

【0143】

TK LIAISON (登録商標) アッセイおよびELISAアッセイを用いた健常な血液ドナー10名からの血清中のTK1活性およびタンパク質レベルを測定することにより、2つのアッセイのカットオフ値を推定した。90%特異性でのTK LIAISON (登録商標) アッセイの感受性は、0.29と計算された。このことは、10のうち1の偽陽性を許容するカットオフ(血液ドナーの値に基づく)では、TK LIAISON (登録商標) アッセイが真陽性の29%を同定し得るということを意味する(癌患者の血清値に基づく)。ELISAアッセイの場合、感受性は0.75であった。したがって、酵素活性を測定するTK1活性アッセイと比較して、ELISAアッセイには固形腫瘍疾患患者を同定する有意に高い能力がある。

10

【0144】

前立腺癌患者からの血清28種と乳癌患者の血清28種とを合わせた群を並行してテストした場合、2つのアッセイで得られた値の間には有意な相関($r = 0.85$)があった。固形腫瘍患者の血中に不活性の血清TK1が高割合で存在するというのが[17、18]、おそらく先に記載された結果への1つの説明であろう。

【0145】

実施例7:モノクローナル抗TK1抗体のCDR領域の配列決定

総RNAを凍結ハイブリドーマ細胞から抽出し、cDNAをRNAから合成した。その後、RT-PCRを実施して、抗体の可変領域(重鎖および軽鎖)を増幅させて、その後、別々に標準クローニングベクターにクローニングして配列決定した。

20

【0146】

TRIzol (登録商標) Plus RNA Purification System (Invitrogen, Cat. No. 15596-026)の技術マニュアルに従って、総RNAをハイブリドーマ細胞から単離した。総RNAをアガロースゲル電気泳動により分析した。より詳細には、試料の単離された総RNAを、1.5%アガロース/Gel Red (商標)ゲルでDNAマーカであるMarker III (TIANGEN, Cat. No. MD103)と並べて泳動させた。図6Aは、DNAマーカMarker IIIの電気泳動アガロースゲルを示しているが、図6B~6Dは、DNAマーカMarker III (レーンM)と、XPA210-Ar1 (図6B)、XPA210-Ar2 (図6C)およびXPA210-Ar3 (図6D)が生成したハイブリドーマ細胞の総RNAを含む対応する電気泳動アガロースゲルを示している。

30

【0147】

SuperScript (商標) III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Cat. No. 18080-051)の技術マニュアルに従って、アイソタイプ特異性抗センスプライマーまたはユニバーサルプライマーを用いて総RNAをcDNAに逆転写した。VHおよびVLの抗体フラグメントを、GenScriptのRACEの標準操作手順に従って増幅させた。

【0148】

より詳細には、各試料のPCR産物4 μ lを、図7A~7Cに示された1.5%アガロース/Gel Red (商標)ゲルで、DNAマーカMarker IIIと並べて泳動させた。PCR産物を精製して、更なる使用まで-20 $^{\circ}$ Cで貯蔵した。図7A~7CのレーンMはDNAマーカMarker IIIを示し、レーン1および2は、それぞれXPA210-Ar1 (図7A)、XPA210-Ar2 (図7B)およびXPA210-Ar3 (図7C)のVHおよびVLフラグメントに対応している。

40

【0149】

標準的分子クローニング手順を利用して、増幅された抗体フラグメントを別々に標準クローニングベクターにクローニングした。

【0150】

コロニーPCRスクリーニングを実施して、正しいサイズの挿入物を有するクローンを

50

同定した。正しいサイズの挿入物を有する単一コロニー5つ以上を、各抗体フラグメントについて配列決定した。より詳細には、正しいVHおよびVL挿入サイズを有する5つの単一コロニーを、配列決定のために送付した。5つの異なるクローンのVHおよびVL遺伝子は、ほぼ同一であることが見出された。以下に列挙されるコンセンサス配列は、各ハイブリドーマ細胞により生成された抗体の配列であると思われる。

【表4】

XPA 210-Ar1

重鎖：DNA配列 (405 bp) – SEQ ID NO: 37

リーダー配列 -FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTAACTGCAGGTGTCCAATCCCAGGT
TCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAATGAAGCTGTCCTGCA
AGGCTTTGGGCTACACATTA**ACTGACTATGAAATGC**ACTGGGTGAAACAGACACCTGCGCAT
GGCCTGGAATGGATTGGAG**CTATTCATCCAGGATATGGTGGTACTGCCTATAATCAGAAGTT**
CAAGGGCAAGGCCCACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCA
GCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTACTGTACA**ACTTTTATTACTAAATTTGACTAC**
TGGGGCCAAGGCACC**ACTCTCACAGTCTCCTCA**

10

20

重鎖：アミノ酸配列 (135 aa) – SEQ ID NO: 38

リーダー配列 -FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

MEWSWVFLFLLSVTAGVQSQVQLQQSGAELVLRPGASMKLSCKALGYTLT**DYEMHWVKQTPAH**
GLEWIGAIHPGYGGTAY**NQKFKG**KATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCT**TFITKFDY**
WGQGTTLTVSS

軽鎖：DNA配列 (396 bp) – SEQ ID NO: 39

リーダー配列 -FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

ATGATGAGTCCTGCCAGTTCCTGTTTCTCTTAGTGCTCTGGATTCGGGAAACCAACGGTGA
TGTTGTCCTGACCCAGACTCCACTCACTTTGTGGTAACCATTGGACAACCAGCCTCCATCT
CTTGCA**AGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACTTTTTTGAATTGGTTGTTA**
CAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGTCTAATCTATCTGGTGTCTAA**ACTGGACTCTGGAGT**
CCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTT**CACACTGAGAATCAGCAGAGTGG**
AGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCA**AGGTACACATTTTCCGTGGACGTTCCGGT**
GGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

30

40

軽鎖：アミノ酸配列 (132 aa) – SEQ ID NO: 40

リーダー配列 -FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

MMSPAQFLFLLVLWIRETNGDVVLTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTFLNWLL
 QRPQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGVYYCWQGFHPWTFG
 GGTKLEIK

XPA 210-Ar2

重鎖：DNA配列 (405 bp) – SEQ ID NO: 41

リーダー配列 -FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTAACTGCAGGTGTCCAATCCCAGGT
 TCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAACTGTCTGCA
 AGGCTTTGGGCTACACATTTACT**GACTATGAAATGCAC**TGGGTGAGGCAGACACCTGTGCAT
 GGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTCTTCCAGGAAGTGGTGGTACTGCCTACAATCAGAAGTT
CAAGGGCAAGGCCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCA
 GCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTACTGTACTACT**TTGATTACGACCTTTGACTAC**
 TGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

10

20

重鎖：アミノ酸配列 (135 aa) – SEQ ID NO: 42

リーダー配列 -FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

MEWSWVFLFLLSVTAGVQSQVQLQQSGAELVLRPGASVKLSCKALGYTFTDYEMHWVRQTPVH
 GLEWIGAILPGSGGTAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCTT**LIITTFDY**
 WGQGTTLTVSS

軽鎖：DNA配列 (396 bp) – SEQ ID NO: 43

リーダー配列 -FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

ATGATGAGTCCTGCCAGTTCCTGTTTCTGTTAGTGCTCTGGATTTCGGGAAACCAACGGTGA
 TGTTGTGTTGACCCAGACTCCACTCACATTGTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCTCCATTT
 CTTGTAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAATTGGTTGTTA
 CAGAGGCCAGGCCAGTCTCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAATTGGACTCTGGAGT
 CCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCAGAGTGG
 AGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCGTGGACGTTCCGGT
 GGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA

30

40

軽鎖：アミノ酸配列 (132 aa) – SEQ ID NO: 44

リーダー配列 -FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

MMSPAQFLFLLVLWIRETNGDVVLTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL
 QRPQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHTFPWTFG
 GGTKLEIK

XPA 210-Ar3

重鎖：DNA配列 (411 bp) – SEQ ID NO: 45

リーダー配列 -FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTGCCTGTTACAGCCTTTCCTGGTATCCTGTCTGATGTGCA
 GCTTCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTGAAACCTTCTCAGTCACTTTCACTCACCTGCACTG
 TCACTGGCTACTCCATCACCA**GTGGTTATAGCTGGCACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAAC**
 AACTGGAATGGTTGGGC**TACATACACTATAGTGGTAGCACTACCTACAACCCATCTCTCAA**
AGGTCGGATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCTGCAGTTGAATTCTG
 TGA**CTACTGAGGACACTGCCACATATTACTGTGCAAGATGGGGTACTGGCCACTGGTACTTC**
GATGTCTGGGCCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

10

20

重鎖：アミノ酸配列 (137 aa) – SEQ ID NO: 46

リーダー配列 -FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

MRVLILLCLFTAFPGILSDVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSGYSWHWIRQFPGN
 KLEWLGYI**HYSGSTTYNPSLKGR**ISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCAR**WGTGHWYF**
 DVWAAGTTVTVSS

軽鎖：DNA配列 (384 bp) – SEQ ID NO: 47

リーダー配列 -FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

ATGGCCTGGATTTCACTTATACTCTCTCTCCTGGCTCTCAGCTCAGGGGCCATTTCCAGGC
 TGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACACATCACCTGGTAAACAGTCACACTCACTTGTC
GCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACTACTAACTATGCCAACTGGGTCCAAGAAAAACCAGAT
 CATTTATTTCACTGGTCTAATAGGTGG**TACCAACAACCGAGTTCCAGGTGTTCCCTGCCAGATT**
 CTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAGACTGAGGATG
 AGGCAATATATTTCTGT**GCTCTATGGTACAGCAACCAT**TGGGTGTTTCGGTGGAGGAACCAAA
 CTGACTGTCCTA

30

40

軽鎖：アミノ酸配列 (128 aa) – SEQ ID NO: 48

リーダー配列 -FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

MAWISLILSLALLSSGAISQAVVTQESALTTSPGKTVTLTCRSSSTGAVTTTNYANWVQEKPD
HLFTGLIGGTNNRVPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHVWVFGGGTK
LTVL

【0151】

実施例8：モノクローナル抗TK1抗体のアイソタイプ同定

ハイブリドーマ細胞株XPA210-Ar1からのモノクローナル抗TK1抗体を、アイソタイプングアッセイに用い、それをSBA Clonotyping (商標) System-HRP (Southern Biotech, Cat. No. 5300-05) の技術マニュアルに従って実施した。モノクローナル抗体XPA210-Ar1のアイソタイプは、IgG1重鎖およびK軽鎖であると決定された。以下の表3を参照されたい。

【表5】

表3—ストック上清のアイソタイプ同定

	アイソタイプ	450nmでの吸光度
重鎖	IgG1	1.604
	IgG2a	0.168
	IgG2b	0.134
	IgG3	0.138
	IgA	0.150
	IgM	0.133
軽鎖	K	0.418
	λ	0.153

【0152】

先に表された実施例には、临床上関係する十分な特異性および感受性のある日常的インビトロ診断アッセイを確立するために用いられ得るモノクローナル抗TK1抗体の対の生成および選択が開示されている。そのような抗体対XPA210-Ar1およびXPA210-Ar2の免疫化、選択および特徴づけを記載し、健全な血液ドナー、ならびに乳癌および前立腺がんの患者からの試料によるプロトタイプのサンドイッチELISAアッセイを実施して、利用可能なTK Liaisonアッセイよりも高感度の期待のできる結果を生じた。

【0153】

最初の選択方法は、酵素の細胞周期調節に関与するC末端ドメインを表すTK1の選択された領域を有するペプチドコンジュゲートに基づいた。

【0154】

3つのモノクローナル抗体が選択されたが、それらの独特の特性は、それらがヒトTK1の血清形態に効率的に結合することである。これが独特であるのは、他の複数の抗体が抗原ペプチドおよびヒトrTK1に結合し得るが、これらの3つの抗体のみがヒト血清を利用したサンドイッチ免疫アッセイ形式で機能し得るためである。

【0155】

抗体の2つ(XPA210-Ar1およびXPA210-Ar3)をペプチド-BSAコンジュゲートで得て、1つ(XPA210-Ar2)はペプチドKLHコンジュゲートで生成させた。4つのクローンが最初に選択されたのにも関わらず、この能力を示すヒトrTK1での免疫化により得られることが見出された所望の特徴を有する抗体は、存在しなかった。この結果は、現在、市販のモノクローナル抗TK1抗体が複数あり、それでもこれらの抗体に基づく臨床使用に開発されたアッセイがない、という事実によるものである。

【0156】

市販のモノクローナル抗体の4つ(Abcamの3B3.E11; M02、Abnovaのclone F12; AbnovaのウサギMab EPR3194およびE

10

20

30

40

50

PR3193)を、本明細書に記載されたサンドイッチELISAアッセイ形式でテストしたが、それらのいずれも、血清TK1と十分に反応することができなかった。それゆえ、rTK1に基づく適切なモノクローナル抗体の生成は、非効率的のようであり、血液で見出されたTK1タンパク質の複雑なオリゴマー構造に関係する可能性がある。

【0157】

本明細書に記載されたモノクローナル抗TK1抗体の独特の性質は、おそらく一部として、それらのエピトープ結合特性が異なっていて、効率的免疫検出については相補的になるためであろう。

【0158】

開示されたプロトタイプのエリサアッセイでは、XPA210-Ar1およびXPA210-Ar2を用いた。あるいはこれらの抗体の1つを、XPA210-Ar3と交換することができた。さらに、免疫アッセイの改善されたアッセイのため、または特殊な適用のためには、おそらくXPA210-Ar3の利用可能性が、非常に有益であろう。これらのモノクローナル抗TK1抗体の存在は、機能的ELISAアッセイの一必要条件である。

【0159】

実施例9：組換えTK1と、XPA210-Ar1およびXPA210-Ar2との相互作用の結合試験

組換えTK1と、サンドイッチELISA手順で用いられた2つのモノクローナル抗体との相互作用の結合特性を測定するために、予備結合試験を、表面共鳴センサー技術で、より具体的にはAttana200デュアルチャネルコンティニューアスフローシステムにより実施した。この方法は、水晶振動子マイクロバランス法に基づいており、抗体-抗原相互作用の結合特性に関係する生物学的関連性の高い情報を提供する。

【0160】

図8Aおよび8Bに示された実験において、LNBカルボキシルセンサーチップを用い、それをアミンカップリング手順でMouse IgG Captureキット(Biacore、GE Healthcare)と予備反応させた。リガンドはXPA210-Ar1およびXPA210-Ar2であり、それらを、10mM酢酸緩衝液pH4.5中の50µg/ml抗体溶液の2回の注射により抗マウス抗体を有する表面に捕捉させた。捕捉抗体を含まない同一処理されたチップを、陰性対照として用いた。10mM HEPES、150mM NaCl、0.005% Tween 20、pH7.4で20µg/mlに希釈された純粋な組換えTK1を、25µl/分で表面に注射した。結合時間は84秒であり、解離をさらに300秒間測定した。組換えTK1を含まない緩衝液をブランクとして注射し、試料注射シグナルから差し引いた。

【0161】

反応速度の測定を、20µg/mlから1.25µg/mlの5種の組換えTK1濃度での一連の注射により実施し、XPA210-Ar1およびXPA210-Ar2の結果をそれぞれ図8Aおよび8Bに示す。図8Aおよび8Bに示された二重参照データのフィッティングされた曲線から反応速度定数を計算するために、1:1結合モデルを用いた。予備結合試験により示された結果から、組換えTK1とXPA210-Ar1(KD=0.65)およびXPA210-Ar2(KD=4.12nM)とのナノモル(nM)親和性が実証された。さらにその結果から、XPA210-Ar1と組換えTK1の間に、XPA210-Ar2と組換えTK1の間の相互作用に比較して有意に強い相互作用があると考えられることが示される。

【0162】

先に記載された実施形態は、本発明の数例の例示的实施例として理解されなければならない。本発明の範囲を逸脱することなく、様々な改良、組み合わせおよび変更が施されることは、当業者に理解されよう。特に、異なる実施形態にある異なる部分的解決法を、技術的に可能な限り、他の形態で組み合わせることができる。

【0163】

参考資料

- [1] Gronowitz, J.S., Hagberg, H., Kallander, C.F., Simonsson, B., 1983, The use of serum deoxythymidine kinase as a prognostic marker, and in the monitoring of patients with non-Hodgkin's lymphoma. *British Journal of Cancer* 47, 487-495.
- [2] Karlstrom, A.R., Neumuller, M., Gronowitz, J.S., Kallander, C.F., 1990. Molecular forms in human serum of enzymes synthesizing DNA precursors and DNA. *Molecular and Cellular Biochemistry* 92, 23-35.
- [3] He, Q.M., Skog, S., Wang, N.N., Eriksson, S., Tribukait, B., 1996. Characterization of a peptide antibody against a C-terminal part of human and mouse cytosolic thymidine kinase, which is a marker for cell proliferation. *European Journal of Cell Biology* 70, 117-124.
- [4] Zhang, F., Li, H., Pendleton, A.R., Robison, J.G., Monson, K.O., Murray, B.K., O'Neill, K.L., 2001. Thymidine kinase 1 immunoassay: a potential marker for breast cancer. *Cancer Detection and Prevention* 25, 8-15.
- [5] He, Q., Zou, L., Zhang, P.A., Liu, J.X., Skog, S., Fornander, T., 2000. The clinical significance of thymidine kinase 1 measurement in serum of breast cancer patients using anti-TK1 antibody. *The International Journal of Biological Markers* 15, 139-146.
- [6] Hallek, M., Langenmayer, I., Nerl, C., Knauf, W., Dietzfelbinger, H., Adorf, D., Ostwald, M., Busch, R., Kuhn-Hallek, I., Thiel, E., Emmerich, B., 1999. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 93, 1732-1737.
- [7] O'Neill, K.L., Zhang, F., Li, H., Fujia, D.G., Murray, B.K., 2007. Thymidine kinase 1 - A prognostic and diagnostic indicator in ALL and AML patients. *Leukemia* 21, 560-563.
- [8] von Euler, H., Eriksson, S., 2011. Comparative aspects of the proliferation marker thymidine kinase 1 in human and ca

- nine tumor diseases. *Veterinary and Comparative Oncology* 9, 1-15.
- [9] Ohrvik, A., Lindh, M., Einarsson, R., Grassi, J., Eriksson, S., 2004. Sensitive nonradiometric method for determining thymidine kinase 1 activity. *Clinical Chemistry* 50, 1597-1606.
- [10] He, Q., Fornander, T., Johansson, H., Johansson, U., Hu, G.Z., Rutqvist, L.E., Skog, S., 2006. Thymidine kinase 1 in serum predicts increased risk of distant or loco-regional recurrence following surgery in patients with early breast cancer. *Anticancer Research* 26, 4753-4759.
- [11] He, Q.M., Zhang, P.G., Zou, L., Li, H.X., Wang, X.Q., Zhou, S., Fornander, T., Skog, S., 2005. Concentration of thymidine kinase 1 in serum (S-TK1) is a more sensitive proliferation marker in human solid tumors than its activity. *Oncology Reports* 14, 1013-1019.
- [12] He, E., Xu, X.H., Guan, H., Chen, Y., Chen, Z.H., Pan, Z.L., Tang, L.L., Hu, G.Z., Li, Y., Zhang, M., Zhou, J., Eriksson, S., Fornander, T., Skog, S., 2010. Thymidine kinase 1 is a potential marker for prognosis and monitoring the response to treatment of patients with breast, lung, and esophageal cancer and non-Hodgkin's lymphoma. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. 29, 352-358.
- [13] Wu, C., Yang, R., Zhou, J., Bao, S., Zou, L., Zhang, P., Mao, Y., Wu, J., He, Q., 2003. Production and characterisation of a novel chicken IgY antibody raised against C-terminal peptide from human thymidine kinase 1. *Journal of Immunological Methods* 277, 157-169.
- [14] Sherley, J.L., Kelly, T.J., 1988. Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. *Journal of Biological Chemistry* 263, 8350-8358.
- [15] Ke, P.Y., Chang, C.-F., 2004. Mitotic degradation of human thymidine kinase 1 is dependent on the anaphase-promoting complex/cyclosome-CDH1-mediated pathway. *Molecular and Cellular Biology* 24, 514-526.
- [16] Eriksson, S., Munch-Petersen, B., J

ohansson, K., Eklund, H., 2002. Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 1327-1346.

[17] Sharif, H., Kiran Kumar, J., Wang, L., He, E., Eriksson, S., 2012. Quaternary structures of recombinant, cellular, and serum forms of Thymidine Kinase 1 from dogs and humans. *BMC Biochemistry* 13, 12.

10

[18] Kiran Kumar J, Sharif, H., Westberg, S., von Euler, H., Eriksson, S., 2013. High levels of inactive thymidine kinase 1 polypeptide in sera from dogs with solid tumours by immunoaffinity methods: Implications for in vitro diagnostics. *The Veterinary Journal* 197, 854-860.

[19] Flemington, F., Bradshaw Jr., H.D., Traina-Dorge, V., Slagel, V., Deininger, P.L., 1987. Sequence, structure and promoter characterization of the human thymidine kinase gene. *Gene* 52, 267-277.

20

[20] Welin M, Kosinska U, Mikkelsen NE, Carnrot C, Zhu C, Wang L, Eriksson S, Munch-Petersen B, Eklund H, 2004. Structures of thymidine kinase 1 of human and mycoplasmic origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101, 17970-17975.

[21] Wu, J.P., Mao, Y.R., Hu, L.X., Wang, N., Wu, C.J., He, Q., Skog, S., 2000. A new cell proliferating marker: Cytosolic thymidine kinase as compared to proliferating cell nuclear antigen in patients with colorectal carcinoma. *Anticancer Research* 20, 4815-4820.

30

[22] Sharif, H., von Euler, H., Westberg, S., He, E., Wang, L., Eriksson, S., 2012. A sensitive and kinetically defined radiochemical assay for canine and human serum thymidine kinase 1 (TK1) to monitor canine malignant lymphoma. *The Veterinary Journal* 194, 40-47.

40

[23] Gasparri, F., Wang, N., Skog, S., Galvani, A., Eriksson, S., 2009. Thymidine kinase 1 expression defines an activated G1 state of the cell cycle as revealed with site-specific antibodies and Array Scan assays. *European Journal of Cell Biology* 88, 779-785.

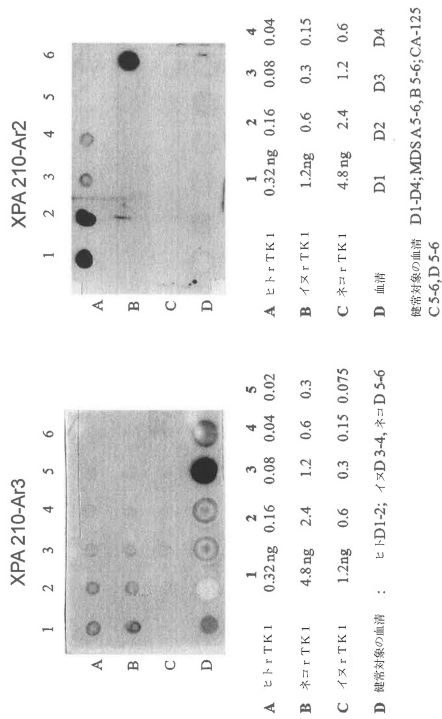
50

[24] WO2004 / 100760号

[25] WO2008 / 142664号

[26] Munch - Petersen B. , 2009 . Reversible tetramerization of human TK1 to the high catalytic efficient form is induced by pyrophosphate , in addition to tripolyphosphates , or high enzyme concentration . FEBS Journal 276 , 571 - 580

【 図 1 】



【 図 2 】

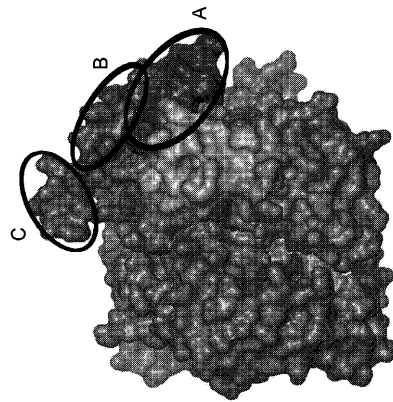
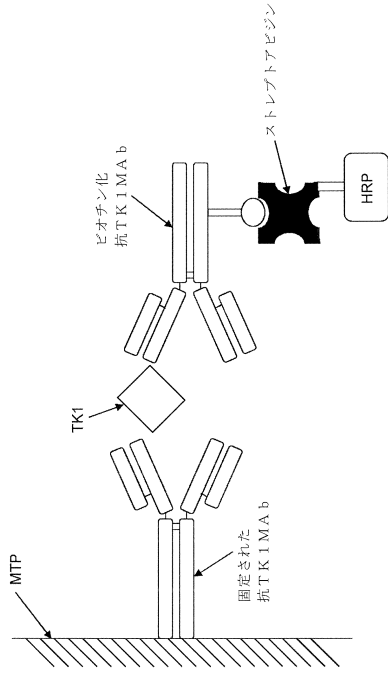
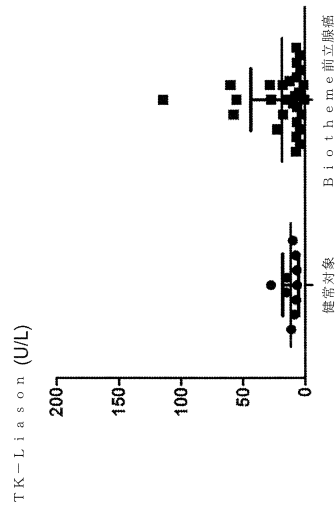


Fig. 2

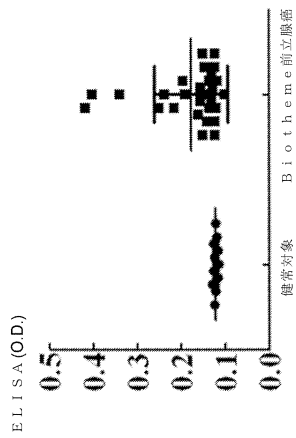
【 図 3 】



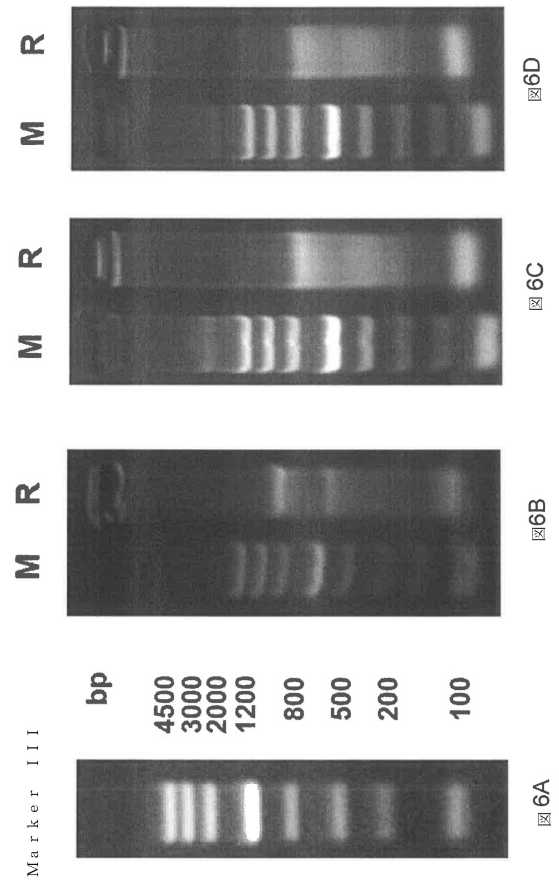
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 A - 6 D 】



【 7 A 】

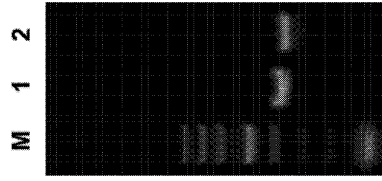


Fig. 7A

【 7 B 】

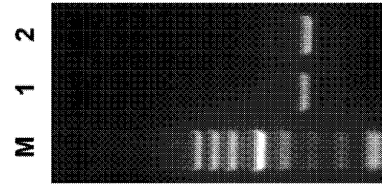


Fig. 7B

【 7 C 】

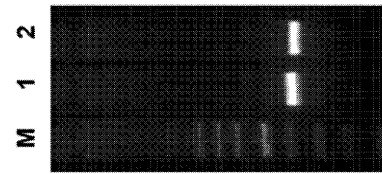
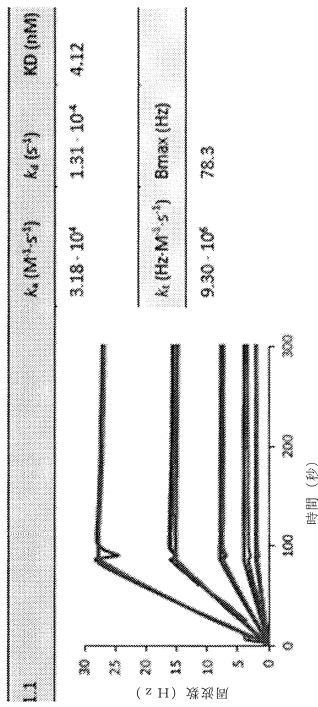
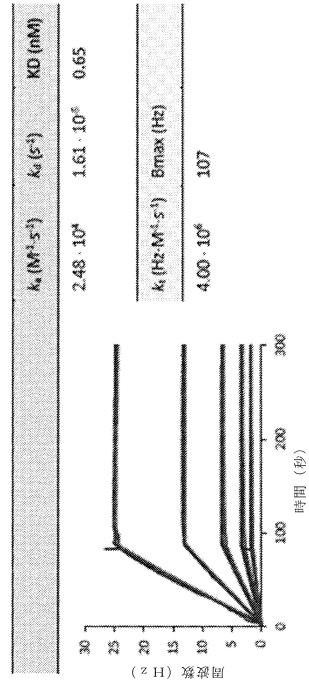


Fig. 7C

【 8 B 】



【 8 A 】



【配列表】

0006715770000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
G 0 1 N 33/543 (2006.01)		G 0 1 N 33/543	5 4 5 A	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	U	
G 0 1 N 33/577 (2006.01)		G 0 1 N 33/574	A	
C 1 2 N 9/12 (2006.01)		G 0 1 N 33/577	B	
		C 1 2 N 9/12		

(72)発明者 エリクソン, スタファン
スウェーデン国, エス 194 34 ウップランド バスビー, カールバーグズバーゲン 12

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 特表2006-526156(JP, A)
国際公開第2008/142664(WO, A2)
中国特許出願公開第102516390(CN, A)
米国特許第06083707(US, A)
中国特許出願公開第1414017(CN, A)
中国特許出願公開第102504027(CN, A)
Abstracts of the 14th International Hamburg Symposium on Tumor Markers, 2008年12月, Anticancer Res., Vol. 28, p. 4074, 128
Eur. J. Cell Biol., 2009年, Vol. 88, pp. 779-785

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0
C 1 2 N 9 / 1 2
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	单克隆抗tk1抗体		
公开(公告)号	JP6715770B2	公开(公告)日	2020-07-01
申请号	JP2016541139	申请日	2014-12-18
[标]申请(专利权)人(译)	阿洛赛尔公司		
申请(专利权)人(译)	アロセルe比		
当前申请(专利权)人(译)	アロセルe比		
[标]发明人	エリクソンスタファン		
发明人	エリクソン,スタファン		
IPC分类号	C07K16/40 C12N15/13 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/574 G01N33/577 C12N9/12		
CPC分类号	C07K16/40 C07K2317/34 C12N9/1211 C12Y207/01021 G01N33/573 G01N2333/9122 G01N2800/7023 G01N2800/26 G01N2800/54		
FI分类号	C07K16/40.ZNA C12N15/13 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/53.D G01N33/543.545.A G01N33/53.U G01N33/574.A G01N33/577.B C12N9/12		
代理人(译)	Iwahori明代		
审查员(译)	鈴木隆行		
优先权	1351531 2013-12-19 SE		
其他公开文献	JP2017503787A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

实施方案涉及能够与人TK1的血清形式结合的单克隆抗体或片段,并且涉及使用这种单克隆抗体或片段的试剂盒和方法。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6715770号 (P6715770)
(45) 発行日 令和2年7月1日(2020.7.1)		(24) 登録日 令和2年6月11日(2020.6.11)
(51) Int. Cl. F I		
C07K 16/40 (2006.01)	C07K 16/40	ZNA
C12N 15/13 (2006.01)	C12N 15/13	
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53	D
請求項の数 18 (全 42 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2016-541139(P2016-541139)	(73) 特許権者 516178859	
(8) (22) 出願日 平成26年12月18日(2014.12.18)	アロセル エービー	
(6) (23) 公表番号 特表2017-503787(P2017-503787A)	スウェーデン国, エス-754 50 ウ	
(4) (24) 公表日 平成29年2月2日(2017.2.2)	ブサラ, ハーディングス アレ 32 ビ	
(8) 国際出願番号 PCT/SE2014/051535		
(87) 国際公開番号 W02015/094106	(74) 代理人 100114775	
(87) 国際公開日 平成27年6月25日(2015.6.25)	弁理士 高岡 亮一	
審査請求日 平成29年12月14日(2017.12.14)	(74) 代理人 100121511	
(31) 優先権主張番号 1351531-7	弁理士 小田 直	
(32) 優先日 平成25年12月19日(2013.12.19)	(74) 代理人 100202751	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 スウェーデン(SE)	弁理士 岩堀 明代	
	(74) 代理人 100191086	
	弁理士 高橋 香元	
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】モノクローナル抗TK1抗体		