

(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2005-534615

(P2005-534615A)

(43) 公表日 平成17年11月17日(2005.11.17)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/30	C07K 16/30	ZNA 4B024
A61K 38/00	A61K 39/00	G 4B064
A61K 39/00	A61K 39/395	L 4B065
A61K 39/395	A61K 49/00	A 4C084
A61K 49/00	A61P 35/00	4C085
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-571313 (P2003-571313)
 (86) (22) 出願日 平成15年2月20日 (2003. 2. 20)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年10月22日 (2004. 10. 22)
 (86) 国際出願番号 PCT/IT2003/000098
 (87) 国際公開番号 W02003/072608
 (87) 国際公開日 平成15年9月4日 (2003. 9. 4)
 (31) 優先権主張番号 60/359, 299
 (32) 優先日 平成14年2月26日 (2002. 2. 26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

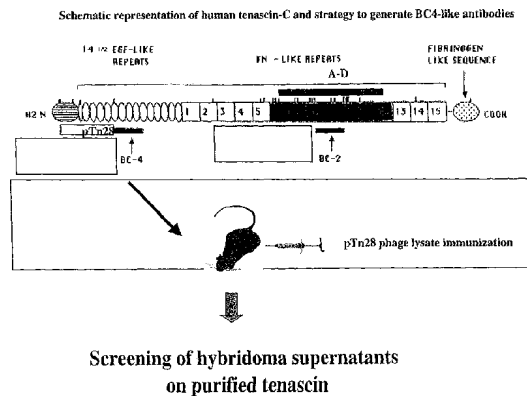
(71) 出願人 591043248
 シグマ-タウ・インドゥストリエ・ファル
 マチュウチケ・リウニテ・ソシエタ・ペル
 ・アチオニ
 SIGMA-TAU INDUSTRIE
 FARMACEUTICHE RIUN
 ITE SOCIETA PER AZI
 ONI
 イタリア00144ローマ、ピアレ・シャ
 ケスベアレ47番
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子

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】

未変性抗原に対して高アフィニティーを有し、高い腫瘍
 選択性を備えた新規な抗-ヒトテネイシンST2146
 モノクローナル抗体を記載する。cST2146ハイブ
 リドーマは安定に高密度の培養条件において抗体を産生
 し、ST2146に基づく産物の工業的開発に好適であ
 る。ST2146は治療および診断用途の両方に利用で
 きる特性を示す。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

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

【請求項 2】

さらにマーカーおよび / または診断薬を含む請求項 1 の抗体およびその断片。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 の抗体およびその断片の組換え誘導体。

【請求項 4】

マウス定常部がヒト対応物または生物学的または薬理的に活性な部分と置換されている請求項 3 の組換え誘導体。

【請求項 5】

該生物学的に活性な部分が以下からなる群から選択される請求項 4 の組換え誘導体：アビジンファミリーのメンバー、腫瘍指向性免疫学的エフェクターの刺激に有用な増殖因子。

【請求項 6】

該薬理的に活性な部分が以下からなる群から選択される請求項 4 の組換え誘導体：毒素、スーパー抗原、サイトカインまたは抗腫瘍治療効力の増強に有用なその他のタンパク質。

【請求項 7】

請求項 1 または 2 の抗体およびその断片の接合体誘導体。

【請求項 8】

生物学的または薬理的に活性な部分が該抗体またはその断片に結合している請求項 7 の接合体。

【請求項 9】

該生物学的に活性な部分が腫瘍指向性免疫学的エフェクターの刺激に有用な増殖因子からなる群から選択されるか、該薬理的に活性な部分が毒素、スーパー抗原、サイトカインまたは抗腫瘍治療効力の増強に有用なその他のタンパク質、抗腫瘍薬、放射性同位元素からなる群から選択される請求項 8 の接合体。

【請求項 10】

テネインに特異的に結合する免疫グロブリン分子。

【請求項 11】

請求項 1 - 10 のいずれかの抗体、またはその断片または組換え誘導体または接合体あるいは免疫グロブリンのビオチン化誘導体。

【請求項 12】

アドバンスドバイオテクノロジーセンターに 2002 年 1 月 29 日にブダペスト条約に従って寄託され、受託番号が P D 0 2 0 0 3 である請求項 1 の抗体を産生するハイブリドーマ細胞系。

【請求項 13】

請求項 12 のハイブリドーマを培養する工程および該抗体を単離する工程を含む請求項 1 の抗体の調製方法。

【請求項 14】

請求項 1 - 10 のいずれかの抗体、またはその断片または組換え誘導体または接合体あるいは免疫グロブリン分子または請求項 11 のビオチン化誘導体のテネインを発現する疾患の検出のための診断手段としての使用。

【請求項 15】

該疾患が腫瘍である請求項 14 の使用。

【請求項 16】

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

10

20

30

40

50

る請求項 15 の使用。

【請求項 17】

該診断手段がインビボイメージング技術に使用される請求項 14 - 16 のいずれかの使用。

【請求項 18】

請求項 1 - 10 のいずれかの抗体またはその断片または組換え誘導体または接合体あるいは請求項 11 のビオチン化誘導体のテネインを発現する疾患の治療用薬物の調製のための使用。

【請求項 19】

該疾患が腫瘍である請求項 18 の使用。

10

【請求項 20】

該腫瘍が、嚢胞性脳腫瘍、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 19 の使用。

【請求項 21】

該薬物が三段階プレ標的化方法の実施に好適なキットの形態である請求項 18 - 20 のいずれかの使用。

【請求項 22】

5つのバイアルから構成され、第一のバイアルが請求項 11 のビオチン化誘導体を含み、第二のバイアルがアビジンを含み、第三のバイアルがビオチン化アルブミンを含み、第四のバイアルがストレプトアビジンを含み、第五のバイアルが放射標識化ビオチンまたはビオチン誘導体を含む治療用キット。

20

【請求項 23】

該バイアルがヒト注射に好適なものである請求項 22 の治療用キット。

【請求項 24】

請求項 1 の抗体またはその断片または請求項 3 または 4 の組換え誘導体あるいは請求項 10 の免疫グロブリンをコードする DNA。

【請求項 25】

CDR からなるか CDR を含む特異的 CDR およびタンパク質。

【請求項 26】

請求項 24 の DNA を含むベクター。

30

【請求項 27】

請求項 26 のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 28】

サンドイッチアッセイにおける請求項 1 - 10 のいずれかの抗体またはその断片または組換え誘導体または接合体の、第二のテネイン - 特異的抗体と組み合わせての循環しているテネインレベルの測定のための診断キットの生産のための使用。

【請求項 29】

請求項 1 - 10 のいずれかの抗体またはその断片または組換え誘導体または接合体あるいは免疫グロブリンを含む診断キット。

【請求項 30】

複数の区画を含んでもよい容器であって、請求項 11 のビオチン化抗体またはその断片あるいは免疫グロブリン、バッファーおよび三段階プレ標的化方法用の治療用キットにおける使用に好適な試薬を含む容器。

40

【請求項 31】

さらに優先的に A - D 断片に向けられた別のテネイン - 特異的抗体を含む請求項 30 の容器。

【請求項 32】

さらに別の腫瘍特異的抗体を含む請求項 30 の容器。

【請求項 33】

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のサンドイッチ

50

E L I S A インビトロアッセイにおける第二のテネイン - 特異的抗体と組み合わせた請求項 1 または請求項 2 の抗体であって、該インビトロ E L I S A アッセイが循環しているテネインレベルの測定に有用である抗体。

【請求項 3 4】

請求項 1 - 1 0 のいずれかの抗体および / またはその断片および / または組換え誘導体および / または接合体および / または免疫グロブリンを、少なくとも 1 つの医薬上許容される賦形剤および / または媒体と組み合わせて含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

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

【背景技術】

【0002】

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

【0003】

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

【0004】

テネインは、細胞外マトリックスタンパク質の 1 つであり、胚発生の際に部位制限性発現を示し、成体組織においては創傷治癒および腫瘍形成、ならびに新規に形成された腫瘍血管においてみられる。テネインは正常な成体組織には発現していないが、様々な固形腫瘍のストローマにおいて発現している。例えば、神経膠腫 (Burdon, et al., Cancer Res. 43:2796-2805, 1983)、乳癌 (Chiquet-Ehrismann, et al., 1986)、肺癌 (Natali et al., Intl. J. Cancer 54:56-68, 1989)、線維肉腫および扁平上皮癌 (Ramos D.M. et al., Int. J. Cancer 75:680-687, 1998) など。テネインは神経膠腫にはみられるが、正常な脳組織にはみられない。テネインについては、国際特許出願第 W O 9 2 / 0 4 4 6 4 号 (Wistar)、および関連する引用文献を参考されたい。

【0005】

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

【0006】

三段階プレ標的化方法についての別の文献としては、国際特許出願第 W O 9 4 / 0 4 7 0 2 号および米国特許第 5 5 7 8 2 8 7 号がある。

【0007】

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

【0008】

10

20

30

40

50

三段階プレ標的化治療の用量および投与時期は最適腫瘍/非腫瘍分布比を達成するために固定されてきた。48のグリア芽細胞腫(GBM)または未分化星状腫(AA)患者から得たデータ(Paganelliらの研究に含まれる)は、実質的に毒性が無く、例外としてストレプトアビジンに対するアレルギー反応(アビジンの使用によって克服されうる)がみられただけであることを示し、治療効果の予備的指標となる。実際、治療終了の2ヶ月後に、25%の患者は腫瘍サイズの減少を示し(完全な応答(腫瘍減少>50%)=6%;部分的応答(腫瘍減少<50%)=11%;低い応答(腫瘍減少<25%)=8%)、52%の患者では進行しなかった。総応答比は77%を超えた。患者のなかには、予測される余命が6ヶ月未満の者もいたが、その応答は1年以上続いた(Paganelli et al., 1999)。

10

【0009】

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

【0010】

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

【0011】

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

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

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

30

【課題を解決するための手段】

【0013】

(発明の概要)

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

【0014】

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

【0015】

(発明の説明)

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

40

【0016】

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

50

【0017】

本発明によると、該抗体は一つの態様において、軽鎖および重鎖可変部の配列がそれぞれ配列番号1および配列番号2であることによって特徴づけられる。これらの配列を図10および11に示す。簡潔に記載するため、本発明による好適な抗体をST2146と称する。本発明は本発明において例示されるようにST2146に関するものであるが、当業者であれば本開示を読むことにより、ST2146以外の類似の抗体および抗体断片、ならびにかかる類似の抗体の抗体断片が本発明の枠内で産生および使用することができることを理解されよう。かかる類似の抗体は当業者にとって合理的な実験量によって産生することができる。

【0018】

本発明はそれゆえテネインに特異的に結合する抗体または抗体断片または抗体キメラ（例えばマウス-ヒト・キメラ）あるいは免疫グロブリン分子を提供する。本発明は、ST2146の可変軽鎖のCDRおよび/またはST2146の可変重鎖のCDRの少なくとも1つを含む抗体または抗体断片または抗体キメラあるいは免疫グロブリン分子を提供する。本発明の抗体または抗体断片または抗体キメラあるいは免疫グロブリン分子は、抗体、Fv断片、Fab断片、F(ab)₂断片、一本鎖抗体、あるいは多量体抗体のいずれであってもよい。本発明の抗体または抗体断片または抗体キメラあるいは免疫グロブリン分子は、IgM、IgD、IgG、IgA、またはIgE分子のいずれであってもよい。

10

【0019】

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

20

【0020】

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

【0021】

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

30

【0022】

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

40

【0023】

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

【0024】

50

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

【0025】

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

10

【0026】

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

20

30

40

50

等物を含む。

【0027】

診断のためには、本発明の抗体、抗体断片、抗体キメラあるいは免疫グロブリン産物に標識（例えば、抗体に直接または間接的に結合した検出可能な化合物または組成物）を結合させてもよい。標識はそれ自体で検出可能なものであってもよいし（例えば、放射性同位元素標識または蛍光標識）、酵素標識の場合、検出可能な基質化合物または組成物の化学変化を触媒するものであってもよい。

【0028】

本発明はまた、CDRの配列において1または複数のアミノ酸を突然変異させることによる開示されたCDRの突然変異体の作成も含む。CDRの適当な位置の一アミノ酸置換により十分にアフィニティーを上昇させることができることが知られている。研究者らは部位特異的突然変異誘発を用いてある種の免疫グロブリン産物のアフィニティーを約10倍上昇させた。このCDRの突然変異による抗体のアフィニティーを増減する方法は一般常識である（例えば、Chapter 23、Paul、W. E.、Fundamental Immunology、Raven Press、NY、N.Y.、1993を参照されたい）。したがって、結合アフィニティーまたは特異性を増減させるための本発明のCDRのアミノ酸の置換、欠失、または付加もまた本発明に含まれる。

10

【0029】

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

20

【0030】

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

30

【0031】

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

【0032】

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

40

【0033】

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

【0034】

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

【0035】

ハイブリドーマ細胞系は、アドバンスドバイオテクノロジーセンター（Advanced Biotechnology Center）、L.go Rosanna Benzi、10 16132 GENOVA- Italyに2002年1月29日にブタペスト条約に従って寄託されており、受託番号はPD02003である。

50

【0036】

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

【0037】

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

10

【0038】

該組換え誘導体を得る方法は当該技術分野で周知である。

【0039】

本発明の別の目的は該抗体の接合体(conjugate)誘導体である。

【0040】

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

20

【0041】

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

【0042】

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

30

【0043】

本発明のさらに別の目的は上記抗体を産生するハイブリドーマ細胞系である。該ハイブリドーマはアドバンスドバイオテクノロジーセンターに2000年1月29日にブダペスト条約に従って寄託されており、受託番号PD02003である。

【0044】

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

【0045】

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

40

【0046】

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

【0047】

本発明のさらに別の態様は、腫瘍の放射免疫療法用の薬物であり、これはテネインを発現する腫瘍を患う対象に投与され、該モノクローナル抗体またはタンパク分解断片あるいはその誘導体を含む。好適な態様において、該モノクローナル抗体またはタンパク分解断片あるいはその誘導体はビオチン化されており、より好適な態様において、薬物は放射免疫療法に適したものであり、特に三段階プレ標的化方法の実施に適したものである。この方法については、例えば欧州特許第0496074号、European Journal of Nuclear

50

Medicine Vol.26、No 4; April 1999; 348-357 および米国特許第 5 9 6 8 4 0 5 号などの文献に記載されている。この後者の態様において、本発明による薬物はキットの形態とすればよく、該キットは5つのバイアルから構成され、ここで第一のバイアルは、ビオチン化抗体またはその断片あるいは誘導体を含み；第二のバイアルはアビジンを含み、第三のバイアルはビオチン化アルブミンを含み、第四のバイアルはストレプトアビジンを含み、第五のバイアルは放射標識化ビオチンまたはビオチン誘導体を含む。このような種類のキットは、European Journal of Nuclear Medicine Vol.26、No 4; April 1999; 348-357 において提供されている。アビジンには、アビジン、ストレプトアビジン、PEG - アビジンまたはPEG - ストレプトアビジン、ジ - またはポリアビジンあるいはジ - またはポリストレプトアビジンが含まれる。放射標識化ビオチンには放射性核種が含まれ、例えば、欧州特許第 0 4 9 6 0 7 4 号に開示されたものであり、好ましくは⁹⁰Yである。ビオチン誘導体は、例えば国際特許出願第 W O 0 2 / 0 6 6 0 7 5 号に開示されている。このような種類のキットは、European Journal of Nuclear Medicine Vol.26、No 4; April 1999; 348-357 において開示されている。好ましくはバイアルはヒト注射に適したものである。

10

【 0 0 4 8 】

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

【 0 0 4 9 】

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

20

【 0 0 5 0 】

本発明の別の態様において、治療用キットにおいて、ビオチン化抗体は別の優先的に A - D 断片に向けられたテネイン - 特異的抗体と組み合わせられる。あるいはビオチン化抗体はその他の腫瘍特異的抗体と組み合わせられる。かかる種類のキットに関する一般的教示は、欧州特許第 0 4 9 6 0 7 4 号、European Journal of Nuclear Medicine Vol.26、No 4; April 1999; 348-357 および米国特許第 5 9 6 8 4 0 5 号に提供されている。

【 0 0 5 1 】

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

30

【 0 0 5 2 】

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

【 0 0 5 3 】

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

40

【 0 0 5 4 】

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

【 0 0 5 5 】

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

50

【0056】

(発明の詳細な説明)

以下の実施例において詳細に説明するように、S T 2 1 4 6 は対応するハイブリドーマ細胞クローン c S T 2 1 4 6 から得られる。

【0057】

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

【0058】

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

10

【0059】

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

【0060】

以下の実施例によってさらに詳細に本発明を説明する。

【実施例1】

20

【0061】

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

30

【0062】

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

40

【0063】

還元 S D S - P A G E 分析によって示されるように S T 2 1 4 6 は軽鎖組成については均質であった。該分析は重鎖はある程度不均一であることを示した。この観察はマウス I g G 2 b アイソタイプについて以前に報告されているような O - 結合型グリコシル化の可変性と矛盾しない (Kim H. et al., J. Biol. Chem. 269(16):12345-12350, 1994)。F C S 含有培地またはタンパク質 - 非含有培地から得た 3 つのバッチからの S T 2 1 4 6 重鎖のバンドパターンが一致することが観察された。S T 2 1 4 6 の重鎖のグリコシド化の可変性を該抗体をシアリダーゼで消化することにより確認した。S T 2 1 4 6 を、HiTrap 脱塩カラム (Amersham-Pharmacia) によってバッファーを 1 0 m M リン酸ナトリウムバッファー (1 5 0 m M N a C l 含有、p H 6 . 4) に交換した。M a b をセントリコン (ce

50

ntricons) 100, 000 MWCO (Millipore) によって終濃度約 1 mg/ml に濃縮し、1.5 U/ml のシアリダーゼ (Sigma) で 37 °C で 24 時間消化した。サンプルを 12 % ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動にかけた。ゲル染色はクーマシーブリリアントブルーによって行った。予測されたように、この消化の結果、高分子量のバンドが除去された (図 2)。ST2146 の全体の均一性をヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーによって確認したところ、ST2146 については単一のピークが示され、BC4 については 3 つのピークが示された (図 3、ここで BC4 について、完全に機能的なものはピーク 3 に対応する)。

【0064】

ST2146 はウェスタンブロット (図 4) および競合的 ELISA (図 5) によって示されるように、BC4 の抗原性エピトープと同一ではないが非常によく関連するエピトープへの結合によってヒトテネインに結合する。図 5 において、ビオチン化 BC4 を様々な濃度のコンペティターとしての BC4、ST2077 または ST2146 と混合し、テネインコーティングしたプレートに入れた。結合は HRP - ストレプトアビジンおよび関連する色素生産性物質の添加により測定した。ST2077 はテネインの EGF - 様リピート中のエピトープを認識する抗体であり、該エピトープは部分的に BC4 エピトープと共通する。

10

【0065】

ST2146 の免疫反応性を BC4 の完全に活性なピーク (ピーク 3) と比較して ELISA によって評価した。図 6 は、最適抗原濃度の ELISA において OD 1.0 が得られる ST2146 の量 (パネル A) は BC4 の完全に反応性のピーク 3 のおよそ 20 分の 1 であり、BC4 のおよそ 100 分の 1 であることを示す。この相違は、抗原制限条件下では劇的に増幅されパネル B に示すように、ST2146 のみが良好な免疫反応性を維持した。

20

【0066】

ST2146 のアフィニティーを BIAcore により評価した。ST2146 の KD は 1.4×10^{-9} であった ($K_a 3.0 \times 10^5$; $k_d 4.1 \times 10^{-4}$)。ST2146 のアフィニティーデータを BC4 と比較した。BC4 の KD は 4.9×10^{-9} ($K_a 1.9 \times 10^5$; $k_d 9.3 \times 10^{-4}$) であることが示された。

【0067】

ビオチン化された場合の免疫反応性の維持はプレ標的化に用いるモノクローナル抗体の基本的特性である。ビオチン化 ST2146 の挙動を評価するため、様々な抗体 : ビオチン比について調べ、ビオチン化抗体の免疫反応性を BC4 および ST1897 を比較して ELISA によって測定した。ST1897 はアフィニティーが低いテネイン - 特異的モノクローナル抗体である。表 1 の結果は低いビオチン化 (2 - 3 ビオチン / モル) はそのアフィニティーにかかわらずモノクローナル抗体の免疫反応性にわずかに影響を及ぼすことを示す。20 ビオチン / モルまでの高いビオチン化は免疫反応性の減少と関連していた。この減少幅がより大きいほど、抗体アフィニティーは低い。

30

【0068】

【表 1】

ST2146のビオチン化研究

Mab	アフィニティー (nM)	%免疫反応性 モル ビオチン / 抗体			
		2-3	3.5-5	7-10	15-20
ST1897	10	84.8 +/-1.3	62.3 +/-12.4	26.65 +/-13.8	9.45 +/-9.26
BC4	4.9	82.4 +/-11.5	74.4 +/-9.3	67.2 +/-12.3	12.6
ST2146	1.4	100	89.6 +/-4.39	77.63 +/-8.59	52.37 +/-3.95

10

【0069】

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

【0070】

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

20

【0071】

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

【0072】

腫瘍塊への局在化能力をしらべるためにビオチン化ST2146の薬理学的挙動を評価した。^{1 2 5}I - 標識化ST2146およびBC4ビオチン化抗体の体内分布研究を、図7のプロトコールにしたがってテネイシンを発現するヒト腫瘍を移植されたヌードマウスについて行った。マウスに皮下に0.1mlの無菌溶液中の 4×10^6 のHT29ヒト大腸癌細胞を与えた。15日後、腫瘍塊がおよそ100mgとなったときに、5マウスの群に静脈内に^{1 2 5}I - 標識化BC4、ST2146または標準マウス免疫グロブリン（nMIg）を0.1mlの無菌PBS中、10、2、0.5または0.1μg / マウスにて与えた。すべての抗体はビオチン化されており（7 - 10ビオチン / モル）、ST2146ビオチン化MabおよびBC4ビオチン化Mabはともに約80%の免疫反応性を示した。各動物には以下の量のCPMを与えた。

30

【0073】

【表 2】

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

40

【0074】

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

50

【 0 0 7 5 】

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

【 0 0 7 6 】

ガンマ重鎖可変部を環状 c D N A から以下のプライマーを用いて増幅した:オリゴマウス 2bCH1 GTC ACTGACTCAGGGAAGTAGCC (配列番号 7); オリゴマウス 2bCH3 GCAACGTGAG ACACGAGGGTCTG (配列番号 8)。これは M. Sassano et al. Nucl. Ac. Res. (1994) 22、1768-1769 に記載のように抗体定常部にアニーリングする。

10

【 0 0 7 7 】

P C R を以下の条件を用いて行った: 9 4 1 分、6 0 1 . 5 分、7 2 2 分、3 0 サイクル。

【 0 0 7 8 】

増幅した断片を S m a I で切断したプラスミド p U C 1 8 に直接クローニングした。カップ軽鎖を含む 2 つのクローンおよびガンマ重鎖可変部を含む 4 つのクローンを配列決定した。配列決定は MWG Biotech、Germany にて行った。両鎖を配列決定した。不明瞭な点はなかった。

【 0 0 7 9 】

図 1 0 は、S T 2 1 4 6 可変軽鎖 (V L) の配列を示す。

20

【 0 0 8 0 】

図 1 1 は、S T 2 1 4 6 可変重鎖 (V H) の配列を示す。

【 0 0 8 1 】

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

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

30

【 0 0 8 2 】

(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.

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

40

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.

Cremonesi M., Ferrari M., Chinol M., Stabin M. G., Grana C., Prisco G., Robertso

50

n C., Tosi G., Paganelli G. Three-step radioimmunotherapy with yttrium-90 biotin : dosimetry and pharmacokinetics in cancer patients. *Eur J Nucl Med* 26(2):110-120, 1999.

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

Parente D., D'Alatri L., Di Massimo AM., Saccinto MP., Novelli S., Pacilli A., Mele A. and De Santis R. Production and in vitro characterization of a recombinant immunotoxin made of a single chain anti-EGF receptor antibody and a type ribosome-inactivating protein (RIP) from filamentous fungus *Aspergillus clavatus*. *Anticancer Research* 17(6A):4073-4074, 1997 10

Kim H, Yamaguchi Y, Masuda K, Matsunaga C, Yamamoto K, Irimura T, Takahashi N, Kato K, Arata Y. O-glycosylation in hinge region of mouse immunoglobulin G2b. *J Biol Chem* 269(16):12345-12350, 1994.

Ferrer C., Anastasi A.M., Di Massimo A.M., Bullo A., Di Loreto M., Raucci G., Pacilli A., Rotondaro L., Mauro S., Mele A. and De Santis R. Expression and characterization of a mouse/human chimeric antibody specific for EGF receptor. *J. Biotechnol.* 52: 51-60, 1996 20

Manuel L. Penichet,* Young-Sook Kang, · William M. Pardridge, · Sherie L. Morrison,* and Seung-Uon Shin. An Antibody-Avidin Fusion Protein Specific for the Transferrin Receptor serves as a Delivery Vehicle for Effective Brain Targeting: Initial Applications in Anti-HIV Antisense Drug Delivery to the Brain 1. *J Immunol* 163: 4421-4426, 1999. 30

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

Paganelli G., Bartolomei M., Ferrari M., Cremonesi M., Broggi G., Maira G., Sturiale C., Grana C., Prisco G., Gatti M., Caliceti P., Chinol M. Pre-targeted loco regional radioimmunotherapy with 90Y-biotin in glioma patients: Phase I study and preliminary therapeutic results. *Cancer Biother & Radiopharm* 16(3):227-235, 2001. 40

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

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

Siri A., Carnemolla B., Saginati M., Leprini A., Casari G., Baralle F. and Zardi 50

L. Human tenascin: primary structure, pre-mRNA splicing patterns and localization of the epitope recognized by two monoclonal antibodies. Nucl Acid Res 19(3):525-531, 1991.

【0083】

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

【図面の簡単な説明】

【0084】

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

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

【図3】図3は、BC4に対するST2146の全体の均一性を示す。

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

【図5】図5は、競合的ELISAを示す。ここでST2146はヒトテネイシンへの結合においてBC4と強く競合しており、ST2077は部分的な競合しか示さない。ST2077はST2146を作成する手順において得られたテネイシン特異的モノクローナル抗体である。ST2077はST2146同様に特異性を示したが(ヒトテネイシンのEGF-様リピート領域)、BC4/ST2146エピトープを部分的にしか阻害しない抗原性エピトープに向けられたものである。

【図6】図6は、BC4の完全に活性化ピークと比較したELISAによるST2146の免疫反応性を示す。

【図7】図7は、ST2146の体内分布研究のプロトコールを示す。

【図8】図8は、BC4と比較したST2146の体内分布を示す(biot = ビオチン化; IR = ELISAにおいて1.0のODを得るための抗体量として表した免疫反応性)。

【図9】図9は、BC4と比較したST2146の腫瘍/非腫瘍比を示す。

【図10】図10は、ST2146可変軽鎖(VL)の配列を示す(配列番号1(全長アミノ酸)、3(アミノ酸をコードするDNA)、9(CDR1の軽鎖アミノ酸)、10(CDR1の軽鎖DNA)、11(CDR2の軽鎖アミノ酸)、12(CDR2の軽鎖DNA)、13(CDR3の軽鎖アミノ酸)、14(CDR3の軽鎖DNA)および21(全長DNA))。

【図11】図11は、ST2146可変重鎖(VH)の配列を示す(配列番号2(全長アミノ酸)、4(アミノ酸をコードするDNA)、15(CDR1の重鎖アミノ酸)、16(CDR1の重鎖DNA)、17(CDR2の重鎖アミノ酸)、18(CDR2の重鎖DNA)、19(CDR3の重鎖アミノ酸)、および20(CDR3の重鎖DNA)および22(全長DNA))。

【配列表】

10

20

30

SEQUENCE LISTING

<110> DE SANTIS, RITA
ANASTASI, ANNA MARIA

<120> ANTI-HUMAN TENASCIN MONOCLONAL ANTIBODY

<130> 2818-141

<140>

<141>

<150> 60/359,299

<151> 2002-02-26

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 142

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
ST2146 light chain variable region protein sequence

<400> 1

Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
1 5 10 15

Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro
20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
35 40 45

Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe
85 90 95

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile
130 135 140

10

20

30

<210> 2
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 ST2146 heavy chain variable region protein sequence

<400> 2
 Lys Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Val Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

20

<210> 3
 <211> 426
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 ST2146 light chain variable region cDNA sequence

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(426)

30

<400> 3
 atg agg tgc cta gct gag ttc ctg ggg ctg ctt gtg ctc tgg atc cct 48
 Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
 1 5 10 15
 gga gcc att ggg gat att gtg atg act cag gct gca ccc tct gta cct 96
 Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro
 20 25 30

gtc act cct gga gag tca gta tcc atc tcc tgc agg tct agt aag agt 144
 Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
 35 40 45

ctc ctg cat agt aat ggc aac act tac ttg tat tgg ttc cta cag agg 192
 Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg
 50 55 60

cca ggc cag tct cct cag ctc ctg ata tat cgg atg tcc aac ctt gcc 240
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala
 65 70 75 80

tca gga gtc cca gac agg ttc agt ggc agt ggg tca gga act gct ttc 288
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe
 85 90 95

aca ctg aga atc agt aga gtg gag gct gag gat gtg ggt gtt tat tac 336
 Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

tgt atg caa cat cta gaa tat ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag 384
 Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
 115 120 125

ctg gag ctg aaa cgg gct gat gct gca cca act gta tcc atc 426
 Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile
 130 135 140

10

<210> 4
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

20

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 ST2146 heavy chain variable region cDNA sequence

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(360)

<400> 4
 aag gtg aaa ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct ggg gct 48
 Lys Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tat gca ttc act agc tac 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

aac atg tac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt gag tgg att 144
 Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

gga tat att gat cct tac aat ggt gtt act agc tac aac cag aag ttc 192
 Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Val Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

30

50	55	60		
aag ggc aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc aca gcc tac			240	
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr				
65	70	75	80	
atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt			288	
Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys				
85	90	95		
gca aga ggg ggc ggt agt atc tac tat gct atg gac tac tgg ggc caa			336	
Ala Arg Gly Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln				
100	105	110		
ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca			360	10
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser				
115	120			
<p><210> 5 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence</p> <p><220> <223> Description of Artificial Sequence: Primer</p> <p><400> 5 tgtcaagagc ttcaacagga</p>				
			20	20
<p><210> 6 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence</p> <p><220> <223> Description of Artificial Sequence: Primer</p> <p><400> 6 aagatggata cagttggtgc</p>				
			20	
<p><210> 7 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial Sequence</p> <p><220> <223> Description of Artificial Sequence: Primer</p> <p><400> 7 gtcactgact caggaagta gcc</p>				
			23	30
<p><210> 8 <211> 23</p>				

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 8
 gcaacgtgag acacgagggt ctg 23

<210> 9
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

10

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 ST2146 light chain variable region CDR1 peptide sequence

<400> 9
 Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15

<210> 10
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

20

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 ST2146 light chain variable region CDR1 nucleotide sequence

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(48)

<400> 10
 agg tct agt aag agt ctc ctg cat agt aat ggc aac act tac ttg tat 48
 Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

30

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 ST2146 light chain variable region CDR2 peptide sequence

<400> 11
 Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 ST2146 light chain variable region CDR2 nucleotide sequence

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(21)

<400> 12
 cgg atg tcc aac ctt gcc tca
 Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

21

10

<210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 ST2146 light chain variable region CDR3 peptide sequence

<400> 13
 Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr
 1 5

20

<210> 14
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 ST2146 light chain variable region CDR3 nucleotide sequence

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(27)

<400> 14
 atg caa cat cta gaa tat ccg ctc acg
 Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr
 1 5

27

30

<210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
ST2146 heavy chain variable region CDR1 peptide sequence

<400> 15
Ser Tyr Asn Met Tyr
1 5

<210> 16
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
ST2146 heavy chain variable region CDR1 nucleotide sequence

10

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(15)

<400> 16
agc tac aac atg tac 15
Ser Tyr Asn Met Tyr
1 5

<210> 17
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

20

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
ST2146 heavy chain variable region CDR2 peptide sequence

<400> 17
Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Val Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 18
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

30

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
ST2146 heavy chain variable region CDR2 nucleotide sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(51)

<400> 18

tat att gat cct tac aat ggt gtt act agc tac aac cag aag ttc aag 48
 Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Val Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

ggc 51
 Gly

<210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic 10
 ST2146 heavy chain variable region CDR3 peptide sequence

<400> 19
 Gly Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 20
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic 20
 ST2146 heavy chain variable region CDR3 nucleotide sequence

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(33)

<400> 20 33
 ggg ggc ggt agt atc tac tat gct atg gac tac
 Gly Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 21
 <211> 773
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220> 30
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 ST2146 light chain variable region nucleotide sequence

<220>
 <221> CDS
 <222> (292)..(717)

<400> 21
 cgaggatccc ctgtcaagag ctccaacagg aatgagtgtt agagacaaaag gtcctgagac 60

```

gccaccacca gctccccago tccatccat ctccctctt aaggtcttgg aggttcccc 120
acaagcgacc taccactggt gcggtgctcc aaacctcctc cccacctcct tctctcctc 180
ctccctttcc ttggttttta tcatgctaatt atttgacagaa aatattcaat aaagtgagtc 240
tctgcaaaaa aaaaaaaaaa aaaataaccc ctgataagg aagtctcag a atg agg 297
                                     Met Arg
                                     1

tgc cta gct gag ttc ctg ggg ctg ctt gtg ctc tgg atc cct gga gcc 345
Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro Gly Ala
                    5                      10                      15

att ggg gat att gtg atg act cag gct gca ccc tct gta cct gtc act 393
Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr
    20                      25                      30

cct gga gag tca gta tcc atc tcc tgc agg tct agt aag agt ctc ctg 441
Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu
    35                      40                      45                      50

cat agt aat ggc aac act tac ttg tat tgg ttc cta cag agg cca gcc 489
His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly
                    55                      60                      65

cag tct cct cag ctc ctg ata tat cgg atg tcc aac ctt gcc tca gga 537
Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly
                    70                      75                      80

gtc cca gac agg ttc agt ggc agt ggg tca gga act gct ttc aca ctg 585
Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu
                    85                      90                      95

aga atc agt aga gtg gag gct gag gat gtg ggt gtt tat tac tgt atg 633
Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met
    100                      105                      110

caa cat cta gaa tat ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag 681
Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
    115                      120                      125                      130

ctg aaa cgg gct gat gct gca cca act gta tcc atc ttgggtaccg 727
Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile
                    135                      140

agctcgaatt cgtaatcatg tcatagctgt ttctgtgtg aaattg 773

```

<210> 22
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 ST2146 heavy chain variable region nucleotide sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

<400> 22

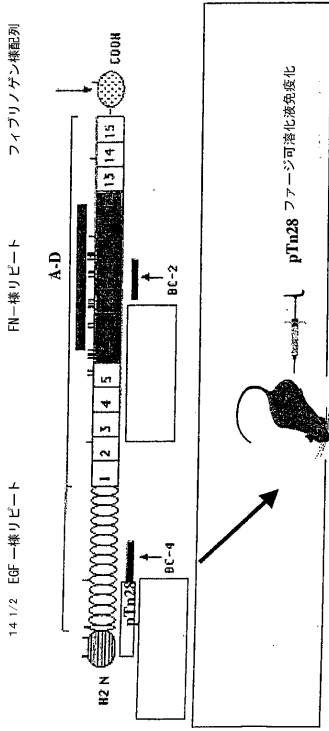
aag	gtg	aaa	ctg	cag	cag	tct	gga	cct	gag	ctg	gtg	aag	cct	ggg	gct	48
Lys	Val	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
tca	gtg	aag	gta	tcc	tgc	aag	gct	tct	ggt	tat	gca	ttc	act	agc	tac	96
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Thr	Ser	Tyr	
			20					25						30		
aac	atg	tac	tgg	gtg	aag	cag	agc	cat	gga	aag	agc	ctt	gag	tgg	att	144
Asn	Met	Tyr	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile	
		35					40					45				
gga	tat	att	gat	cct	tac	aat	ggt	ggt	act	agc	tac	aac	cag	aag	ttc	192
Gly	Tyr	Ile	Asp	Pro	Tyr	Asn	Gly	Val	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	
	50					55					60					
aag	ggc	aag	gcc	aca	ttg	act	ggt	gac	aag	tcc	tcc	agc	aca	gcc	tac	240
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65					70					75				80		
atg	cat	ctc	aac	agc	ctg	aca	tct	gag	gac	tct	gca	gtc	tat	tac	tgt	288
Met	His	Leu	Asn	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
gca	aga	ggg	ggc	ggt	agt	atc	tac	tat	gct	atg	gac	tac	tgg	ggc	caa	336
Ala	Arg	Gly	Gly	Gly	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
			100					105					110			
ggg	acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca									360
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
		115					120									

10

20

【 図 1 】

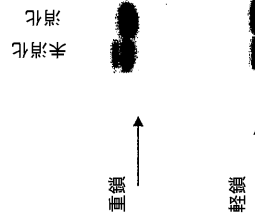
Figure 1: ヒトテネイシン-Cの構造図およびBC4一様抗体の作成の戦略



精製テネイシンについてのハイブリドーマ上清のスクリーニング

【 図 2 】

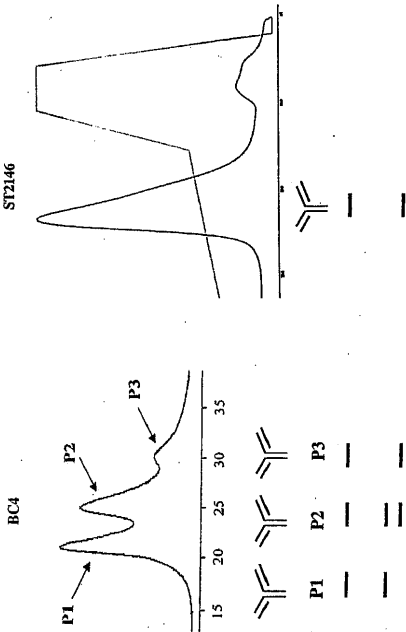
Figure 2: ST2146のシアル酸残基の消化



ST2146を、HiTrap 脱塩カラム (Amersham-Pharmacia) によってバッファを10 mM リン酸ナトリウムバッファ (150 mM NaCl 含有, pH6.4) に交換した。Ma bをセントリコン (centricon) 100, 0.00 MWCO (Millipore) によって終温度約1 mg/mlに濃縮し、1.5 U/mlのシアリダーゼ (Sigma) で37℃で24時間消化した。サンプルを12%ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動にかけた。ゲル染色はクマシーブリリアントブルーによって行った。

【 図 3 】

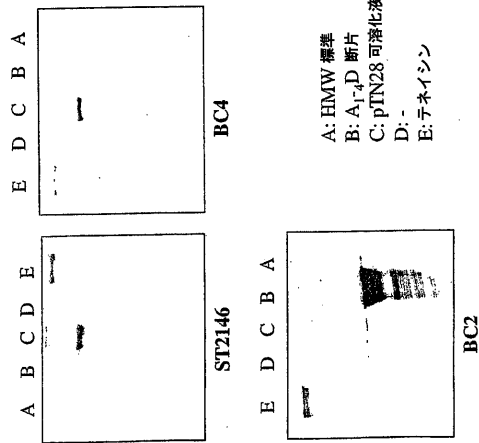
Figure 3: 抗テネイシンMa bであるBC4およびST2146のヒトキシルアパタイトクロマトグラフィー



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

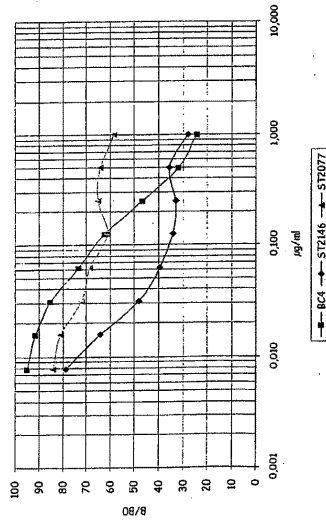
【 図 4 】

Figure 4: 抗テネイシン抗体のウェスタンブロット分析



【 図 5 】

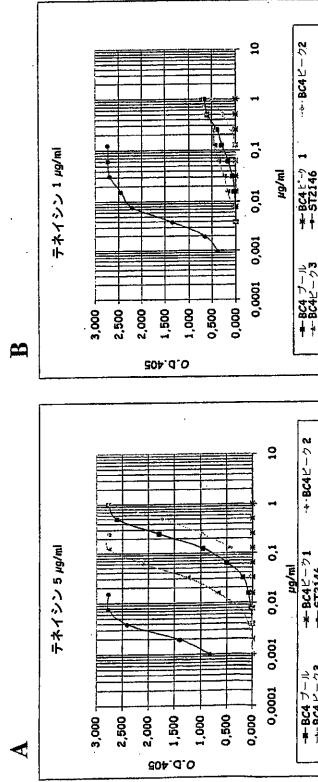
Figure 5: ST2146 競合的 ELISA



ピオチン化BC4を様々な濃度のコンベンタイターとしてのBC4、ST2077またはST2146と混合し、テネイシンコーティングしたプレートに入れた。結合はHRP-ストロプアビジンおよび関連する色素生産性物質の添加により測定した。ST2077はテネイシンのEGF-様ドメイン中のエピトープを認識する抗体であり、該エピトープは部分的にBC4エピトープと共通する。

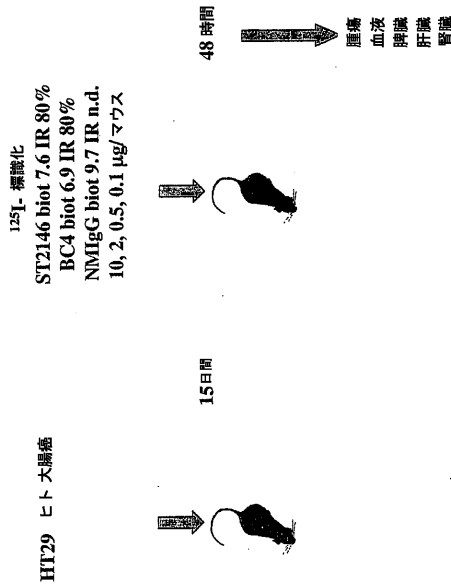
【 図 6 】

Figure 6: ST2146およびBC4の免疫反応性



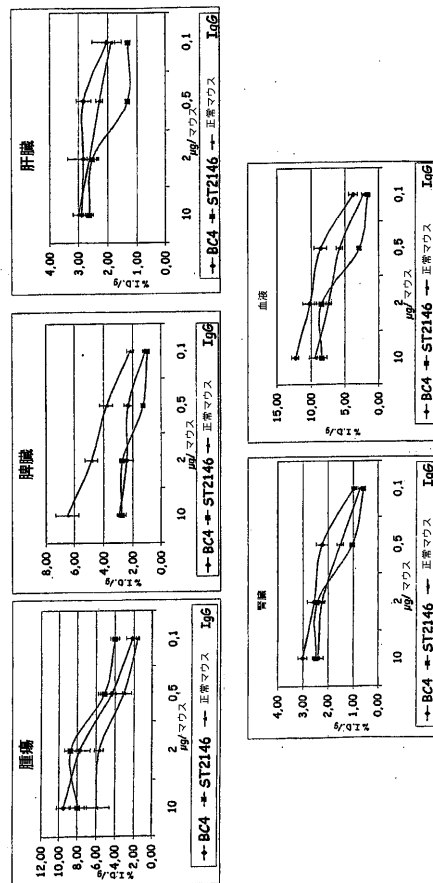
【 図 7 】

Figure 7: 腫瘍移植されたヌードマウスのST2146およびBC4ピオチン化Mabの体内分布研究のプロトコール



【 図 8 】

Figure 8: 腫瘍移植されたヌードマウスにおけるST2146およびBC4ピオチン化Mabの体内分布



【手続補正書】

【提出日】平成16年10月22日(2004.10.22)

【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】

2005534615000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/IT 03/00098
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K16/18 A61K47/48 C12N5/20 A61K39/395 G01N33/574 C12N15/13		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) 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) SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, MEDLINE, EPO-Internal, EMBASE, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PAGANELLI G ET AL: "Antibody-guided three-step therapy for high grade glioma with yttrium-90 biotin" EUROPEAN JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE 1999 GERMANY, vol. 26, no. 4, 1999, pages 348-357, XP008019281 ISSN: 0340-6997 cited in the application abstract page 349, right-hand column, paragraph 1	3-11, 14-32, 34
A	---	1, 2, 12, 13, 33
	--- -/--	
<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 *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
10 July 2003		16/07/2003
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 COVONE-VAN HEES, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/IT 03/00098

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>US 6 335 014 B1 (KUSAKABE MORIAKI) 1 January 2002 (2002-01-01)</p> <p>column 3, line 1-5 column 4, line 30-53</p> <p>----</p>	<p>3,7,8, 10, 18-20, 25,34</p>
X	<p>SHRESTHA PRASHANTA ET AL: "Tenascin in human neoplasia: Immunohistochemical observations using seven different clones of monoclonal antibodies." INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, vol. 8, no. 4, 1996, pages 741-755, XP008019285 ISSN: 1019-6439 page 743, right-hand column, paragraph 5 -page 744, left-hand column, paragraph 1</p> <p>----</p>	<p>10,25</p>
T	<p>DE SANTIS R ET AL: "Novel antitenascin antibody with increased tumour localisation for Pretargeted Antibody-Guided RadioImmunoTherapy (PAGRIT)." BRITISH JOURNAL OF CANCER. ENGLAND 7 APR 2003, vol. 88, no. 7, 7 April 2003 (2003-04-07), pages 996-1003, XP008019208 ISSN: 0007-0920 the whole document</p> <p>-----</p>	<p>1-34</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/IT 03/00098

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 14-17 are directed to a method of treatment of 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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 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

PCT/IT 03/00098

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6335014	B1	01-01-2002	NONE

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	C 0 7 K 16/00	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/00	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 N 15/09	G 0 1 N 33/53	U
C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	B
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 15/00	A
	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, IT, LU, MC, NL, PT, 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, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, 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, M X, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, 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 ボメツィア、ヴィア・ポンティーナ、キロメトロ 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 アンナ・マリア・アナスタシ

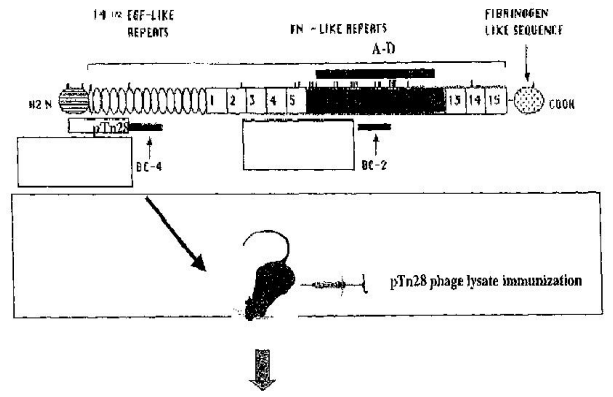
イタリア、イ - 0 0 0 4 0 ボメツィア、ヴィア・ポンティーナ、キロメトロ 3 0 , 4 0 0、シグマ
- タウ・インドゥストリエ・ファルマチェウチケ・リウニテ・ソシエタ・ペル・アチオニ内

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA43 CA01 DA02 GA05 GA11 HA15 HA20
4B064 AG26 AG27 CA10 CC24 DA05 DA14
4B065 AA91X AA91Y AA93Y AB05 AC14 BA02 BA08 CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA03 BA44 DA01 DA27 DA32 MA05 NA05 NA06 NA13
ZB26
4C085 AA19 AA26 AA27 BB01 CC02 CC07 CC08 CC21 CC31 DD23
DD62 DD63 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA50 BA71 BA72 CA40 DA76 EA28
EA51 FA72 FA74

专利名称(译)	抗人肌腱蛋白单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2005534615A	公开(公告)日	2005-11-17
申请号	JP2003571313	申请日	2003-02-20
[标]申请(专利权)人(译)	希格马托制药工业公司		
申请(专利权)人(译)	西格玛 - 头Indusutorie医药崔宇智科Riunite , Soshietta佩尔 - Achioni		
[标]发明人	リタデサンティス アンナマリアアナスタシ		
发明人	リタ・デ・サンティス アンナ・マリア・アナスタシ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K49/00 A61P35/00 C07K16/00 C07K16/18 C07K16/30 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/20 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/574		
CPC分类号	C07K16/18 A61K2039/505 C07K16/30 C07K2317/31 C07K2317/565 G01N33/574 G01N2333/78 Y10S435/81 Y10S435/975		
FI分类号	C07K16/30.ZNA A61K39/00.G A61K39/395.L A61K49/00.A A61P35/00 C07K16/00 C12N1/15 C12N1 /19 C12N1/21 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/53.U C12N5/00.B C12N15/00.A C12N5/00.A A61K37 /02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA43 4B024/CA01 4B024/DA02 4B024/GA05 4B024/GA11 4B024 /HA15 4B024/HA20 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AA93Y 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065 /CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/BA44 4C084/DA01 4C084/DA27 4C084/DA32 4C084/MA05 4C084/NA05 4C084/NA06 4C084/NA13 4C084/ZB26 4C085/AA19 4C085 /AA26 4C085/AA27 4C085/BB01 4C085/CC02 4C085/CC07 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/CC31 4C085/DD23 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045 /BA10 4H045/BA50 4H045/BA71 4H045/BA72 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	田中, 三夫		
优先权	60/359299 2002-02-26 US		
其他公开文献	JP2005534615A5 JP4488746B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了一种新的抗人生腱蛋白ST2146单克隆抗体，其具有与天然抗原的高亲和力和高肿瘤选择性。cST2146杂交瘤在高密度培养条件下稳定地产生抗体，适用于基于ST2146的产品的工业开发。ST2146具有可用于治疗和诊断应用的性质。



**Screening of hybridoma supernatants
on purified tenascin**