

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3542784号
(P3542784)

(45) 発行日 平成16年7月14日(2004.7.14)

(24) 登録日 平成16年4月9日(2004.4.9)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C07K 16/18
A61K 39/395
A61P 9/14
A61P 27/06
A61P 29/00

C O 7 K 16/18 Z N A
A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 K 39/395 E
A 6 1 K 39/395 H
A 6 1 K 39/395 T

請求項の数 6 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-191790 (P2001-191790)	(73) 特許権者	591003013
(22) 出願日	平成13年6月25日 (2001.6.25)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公開番号	特開2002-332300 (P2002-332300A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公開日	平成14年11月22日 (2002.11.22)		E AKTIENGESELLSCHAFT
審査請求日	平成13年6月25日 (2001.6.25)		T
(31) 優先権主張番号	00113344.6		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(32) 優先日	平成12年6月23日 (2000.6.23)		グレンツァーヘルストラツセ124
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	01107799.7		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成13年4月5日 (2001.4.5)	(74) 代理人	100092624
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 鶴田 準一
微生物の受託番号	DSM ACC2458	(74) 代理人	100087871
微生物の受託番号	DSM ACC2459		弁理士 福本 積
微生物の受託番号	DSM ACC2460	(74) 代理人	100082898
微生物の受託番号	DSM ACC2461		弁理士 西山 雅也
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗SEMP1抗体、その製法及び使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

SEMP1抗原に結合する抗体であって、抗体DSM ACC2458、DSM ACC2459、DSM ACC2461及びDSM ACC2463から成る群から選択される抗体と同等な結合性でSEMP1に結合する前記抗体。

【請求項2】

細胞株DSM ACC2458、DSM ACC2459、DSM ACC2460、DSM ACC2461、DSM ACC2462及びDSM ACC2463から成る群から選択される細胞株から得られる抗体。

【請求項3】

細胞株DSM ACC2458、DSM ACC2459、DSM ACC2460、DSM ACC2461、DSM ACC2462及びDSM ACC2463。

【請求項4】

抗体DSM ACC2458、DSM ACC2459、DSM ACC2461及びDSM ACC2463から成る群から選択される抗体と同等な結合性でSEMP1に結合する抗体を生産する方法であって、ヒトを除く、ある哺乳動物種にSEMP1の核酸を免疫接種し、そして次にSEMP1ポリペプチドを免疫接種すること、及びその動物の細胞又は体液から前記抗体を単離することを特徴とする、前記方法。

【請求項5】

請求項1又は2に記載の抗体を0.1~500 mg/mlの量でpH5.0~7.0で含有する組成物。

【請求項6】

請求項1又は2に記載の抗体を含有する組成物の調製方法であって、その組成物中の抗体

の濃度が0.1~500 mg/mlであり、その組成物のpHが5.0~7.0である様に、前記抗体の水溶液を緩衝水溶液と混合する、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒトの密着結合タンパク質SEMP1に対する抗体、その製法、並びに診断及び治療におけるその使用に関する。

【0002】

【従来の技術】

インビボでは哺乳動物細胞の細胞外環境が、細胞接着及び細胞増殖の制御を介して、腫瘍発生性でない正常な細胞活動を規定している。これらの主要な制御要因の損失が、腫瘍発生の顕著な特徴である。

【0003】

最近、オクルディン(occludin)、及びクローディン(claudin)ファミリータンパク質が、細胞接着複合体である密着結合の主要な構成成分として同定された。マウスのclaudin-1は、明らかに、上皮細胞における主要な密着結合タンパク質を構成する(Furuse, M., et al., J. Cell Biol. 141 (1998) 1539-1550; Furuse, M., et al., J. Cell Biol. 143 (1998) 391-401)。最近、ヒト相同体であるSEMP1 (老化関連上皮膜タンパク質, Swiss Prot. Acc. No. 095832, ヒトCLD1)が、分子遺伝学的解析により同定された(Swisshelm, K.A., et al., Gene 226 (1999) 285-295)。

【0004】

細胞間接着としての密着結合、及びその密着性タンパク質が、腫瘍発生に関与するらしいことを示す多くの証拠が報告されている(Porvaznik, M., et al., J. Supramol. Struct. 10 (1979) 13-30; Swift, J.G., et al., J. Submicrosc. Cytol. 15 (1983) 799-810; Hochand-Prillet, B., et al., Ultrastruct. Pathol. 22 (1998) 413-420; Solar, A.P., et al., Carcinogenesis 20 (1999) 1425-1431; Woo, P.L., et al., J. Biol. Chem. 274 (1999) 32818-32828)。更に最近、SEMP1の発現が上皮性の細胞及び組織に独占的であること、しかしその発現はヒト乳ガン腫瘍細胞においてインビトロでは減少調節されているか、又は完全に失われていることも報告されている(Swisshelm, K.A., et al., Gene 226 (1999) 285-295)。

【0005】

腫瘍発生及び/又は腫瘍進行の診断評価、あるいはインビボ又はエキソビボでの治療行為において、密着結合タンパク質又はその関連タンパク質の欠失又は発現を検査するために、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体が必要である。occludinを認識する抗体の作製及び適用が、インビトロで成功している(Furuse, M., et al., J. Cell Biol. 141 (1998) 1539-1550; Furuse, M., et al., J. Cell Biol. 143 (1998) 391-401)。しかし、ヒトSEMP1又はそのマウス相同体claudin-1に対するポリクローナル又はモノクローナル抗体の作製は、非常に困難であった。マウスclaudin-1に対するモノクローナル又はポリクローナル抗体を作製できなかったことも報告されている(Furuse, M., et al., J. Cell Biol. 141 (1998) 1539-1550)。

【0006】

極最近、マウスclaudin-1タンパク質のC末端細胞内ドメインに対するポリクローナル抗体がウサギで作成された。これは、その他の関連する内在性タンパク質とは交差しないものである(clone MH25, Zymed Laboratories Inc., 458 Carlton Court, South San Francisco, CA94080, Catalog No.71-7800, <http://www.zymed.com/products/71-7800.html>)。またマウスclaudin-1のC末端ドメインに対するモノクローナル抗体がラットで作製された(Furuse, M., et al., J. Cell Biol. 147 (1999) 891-903)。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明は、抗体DSM ACC2458, DSM ACC2459, DSM ACC2461及びDSM ACC2463から成る群から

10

20

30

40

50

選択される抗体と同等の結合性でSEMP1(ヒトCLD-1)ポリペプチドに結合するポリクローナル及びモノクローナル抗体を提供する。

本発明の抗体は、マウスclaudin-1のC末端細胞内ドメインに対して、無視できないほどに結合することはない。

【0008】

免疫化のためにSEMP1ポリペプチド断片を用いて抗SEMP1抗体を作製することはできなかったが、驚くことに、DNA免疫接種により、好ましくはSEMP1ポリペプチドの増強免疫接種(ブースト)の追加により、SEMP1特異的抗体を作製することが可能であることが分かった。本発明の方法によれば、SEMP1の全ての部分に対する抗体、特に細胞外ドメインに対する抗体を容易に提供することが可能である。後者の抗体は、SEMP1を介したシグナル伝達の調節に有用である。

10

【0009】

DNAの免疫接種は、現在の技術により可能である。DNAの免疫接種というアイデアは、裸のプラスミドDNAをマウス筋肉に注射することにより、筋繊維へのトランスフェクションを介してトランス遺伝子の発現が起こり、その結果細胞毒性T細胞(CTL)と抗体応答の両方が誘導されたという事実に由来する(Barry, M.A., et al., *Biotechniques* 16 (1994) 616-618 and 620; Davis, H.L., et al., *Hum. Mol. Genet.* 2 (1993) 1847-1851; Davis, H.L., et al., *Vaccine* 12 (1994)1503-1509; Davis, H.L., *Curr. Opin. Biotechnol.* 8 (1997) 635-646; Lowrie, D.B., *Nat. Med.* 4 (1998) 147-148; Ulivieri, C., et al., *J. Biotechnol.* 51 (1996) 191-194)。

20

【0010】

DNAの免疫接種に用いる構成体は、レポーター遺伝子又は治療用遺伝子の供給に用いるものと同じである。基本的に、確立されている真核細胞用発現ベクターのいずれかを用い得る。ほとんどのDNA免疫接種用ベクターは、多様な宿主細胞内でトランス遺伝子を高レベルで発現させるために、強力なウイルス性プロモーター/エンハンサー配列を含んで成る。また、発現したRNAを停止させるために、ポリアデニル化配列も必要である。

【0011】

用語「無視できないほどに結合することはない」とは、従来技術として周知である慣習的な結合検出方法によって抗体結合を検出できないことを意味する。慣習的には、免疫沈降法を用いて抗体結合を調べる。免疫沈降における誤差の通常限界(すなわち「無視できないほどに結合することはない」という意味における限界)は約5%以下である。

30

【0012】

用語「マウスclaudin-1のC末端」とは、そのC末端の細胞内ドメイン又はその一部分を意味する。このドメインは、配列番号4のアミノ酸185から211までである。

【0013】

用語「抗体」は、抗体遺伝子により実質的にコードされる1又は複数のポリペプチドから成るタンパク質を指す。認知されている抗体遺伝子には、種々の定常領域遺伝子及び無数の可変領域遺伝子がある。種々の形態で抗体が存在し、それらには、例えばFv、Fab及びF(ab)₂、更に単一鎖が含まれる(Houston et al., *PNAS USA* 85 (1988) 5879-5883; Bird, R.E., et al., *Science* 242 (1988) 423-426; Hood et al., *Immunology*, Benjamin N. Y., 2nd ed. (1984); Hunkapiller, T., and Hood, L., *Nature* 323 (1986) 15-16)。

40

【0014】

ヒトのFc受容体を発現するヒト以外のトランスジェニック動物により生産された抗体が、特に有用である(WO 99/00010)。なぜならその様な抗体は、ヒト抗体と非常に似ているからである。本発明の好ましい抗体は、SEMP1抗原との相互作用に関して、抗体DSM ACC2458, DSM ACC2459, DSM ACC2461及びDSM ACC2463から成る群から選択される抗体と同じ特性を有するモノクローナル抗体及びその断片である。

別のグループの抗体(DSM2460及びDSM2462)は、SEMP1の細胞内ドメイン(エピトープ2(IC2)、図4参照)に対するものである。

【0015】

50

当該抗体は、好ましくは、少なくとも2つの軽鎖ポリペプチドと2つの重鎖ポリペプチドを含んで成る。その各々の重鎖及び軽鎖ポリペプチドは、抗原と相互作用する結合ドメインを有する可変領域（一般的には当該ポリペプチド鎖のアミノ末端部分）を包含する。また、その各々の重鎖及び軽鎖ポリペプチドは、当該ポリペプチド鎖の定常領域（一般的にはカルボキシ末端）をも包含する。この領域は、抗体と、宿主の組織又は因子、例えば免疫系の種々の細胞、貪食細胞、及び古典的な補体系の第一成分(C1q)との結合を仲介し得る部分である。

【0016】

典型的には、軽鎖及び重鎖ポリペプチドは完全な鎖であり、その各々は、可変領域と完全な定常領域とから本質的に成る。本発明の抗体の可変領域を、別のイソタイプの定常領域に移植することができる。例えば、イソタイプ 1の重鎖の可変領域をコードするポリヌクレオチドを、別の重鎖のクラス（又はサブクラス）の定常領域をコードするポリヌクレオチドに移植することができる。

10

【0017】

更に一般的には、抗原結合を実質的に抑制することなく、場合により、人間に注射した場合に抗体の抗原性を実質的に増加させることなく、本発明の抗体の重鎖及び/又は軽鎖のアミノ酸配列に対して1乃至数個のアミノ酸置換、特に保存的なアミノ酸置換を行うことができる。場合により、1乃至数個のアミノ酸の欠失又は付加を行うことができる。典型的には、定常領域又は可変領域、枠組み構造配列、及び相補性決定領域(CDR)に対してアミノ酸の置換、付加又は欠失を行う。

20

【0018】

保存的なアミノ酸置換は、類似の特性を有するアミノ酸によるアミノ酸置換である（例えば酸性特性を有するアミノ酸：Asp又はGlu）。保存的なアミノ酸置換により、親配列による構造特性が実質的に変化しないことが必要である。その様なポリペプチド構造の例が、Protein, Structure and Molecular Principles, Creighton(editor), W.H. Freeman and Company, New York (1984); Introduction to Protein Structure, C. Brandon and J. Tooze, Garland Publishing, New York (1981); Thornton, J.M., et al., Nature 354 (1991) 105-106に記載されている。

【0019】

例えば、1又は複数のアミノ酸置換（好ましくは保存的なアミノ酸置換）が、天然配列（好ましくは、抗原に直接に接触しないポリペプチドの一部）において行われ得る。本発明の抗体及び方法の範囲内で、同等な結合性でSEMP1に相互作用する多数の別の抗体を見出すことが可能である。その様な抗体は、寄託した抗体と同等な結合性でSEMP1抗原に結合し得る。

30

【0020】

用語「同等な結合性で結合する抗体」とは、注目する抗体によりエピトープの重複が検出される抗体を意味する。このエピトープの重複を、競合検査系を利用して検出することができる。この目的のために、例えば酵素免疫検査を利用して、固定化したSEMP1抗原との結合に関して、ある抗体が既知の抗体と競合する程度を検査する。

【0021】

前記の目的のために、適当に固定化した抗原（例えば、その表面にSEMP1を発現している細胞）を、前記の1つの寄託抗体に由来する標識抗体と、過剰量の注目する抗体と共にインキュベーションする。結合した標識を検出することにより、注目する抗体の結合が前記の標識抗体の結合を置換する程度を容易に確認することができる。その標識抗体に比べて、注目する抗体の濃度が同一である場合、又はより高い場合、好ましくは 10^5 倍過剰である場合に、前記の置換が少なくとも20%、好ましくは少なくとも50%であるならば、エピトープの重複が存在する。

40

【0022】

当該抗体は、それが適当な様式でSEMP1に結合する限り、完全なポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体、それらの断片（例えばFv, (Fv)₂, Fab, Fab', F(ab)₂）、キメラ抗体

50

、ヒト化抗体又はヒト抗体であってよい。CDR領域のみ又は、CD30への特異的結合能を付与するその一部分のみを有する短鎖の抗体断片もまた、特にその抗体が標識される場合には、適する。イソタイプIgG1の抗体が好ましい。

【0023】

モノクローナル抗体の作成に関して、E. Harlow and D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988); Bessler, W.G., et al., *Immunobiol.* 170 (1985) 239-244; Jung, G., et al., *Angewandte Chemie* 97 (1985) 883-885; Cianfriglia, M., et al., *Hybridoma* 2 (1993) 451-457を参照すること。

【0024】

また本発明は、SEMP1抗原、好ましくは図4に示すペプチド1~37、より好ましくはペプチド5、21、29、30及び37に結合する抗体を生産する方法を提供する。この方法では、ある哺乳動物種に、SEMP1の読み枠をコードするプラスミドDNA(SEMP1の核酸)を免疫接種し、次にSEMP1ポリペプチドを免疫接種し、その後抗SEMP1抗体生産B細胞を単離し、それをミエローマ細胞株と融合させ、その融合細胞株を単離し、SEMP1に対する抗体活性を検査し、SEMP1に結合する抗体を生産する細胞株を単離し、その細胞株からモノクローナル抗体(Mab)を生産させ、それを、好ましくは実質的に純粋になるまで、単離する。

10

【0025】

この免疫接種では、好ましくは、約3~5ヶ月間にわたって一月毎にDNA接種を繰り返し、そしてB細胞の単離前約3日間毎日SEMP1ポリペプチドを、増強のために接種する。本発明の方法により、SEMP1ポリペプチド内の全ての免疫原性の領域又はドメインに対するモノクローナル抗体及び/又はポリクローナル抗体を生産することが可能である。

20

【0026】

その様なDNA免疫接種を行った後、当業界に周知の通りに、好ましくはHarlow E. and Lane D., "*Antibodies - A Laboratory Manual*", Cold Spring Harbor Laboratory (1988)に記載の方法に従ってポリクローナル抗体(Pab)が回収される。

【0027】

また本発明は、本発明の抗体の結合特異性を保持し、その抗原結合にとって重要でない領域内が修飾されている、本発明の抗体の誘導体を提供する。当該抗体誘導体を、本発明の抗体から、1又は複数の定常ドメインの交換及び/又は他の分子との連結により得ることができる。

30

【0028】

従って例えば、イソタイプを決定する定常ドメインの交換を行うことができ、例えば、IgMクラスの抗体を、その抗原特異性を維持しつつ、IgGクラスの抗体に転換することができる。このイソタイプの転換を、周知の細胞生物学的又は分子生物学的手法により行い得る(Rothman, P., et al., *Mol. Cell. Biol.* 10 (1990) 1672-1679)。

【0029】

人体内における免疫原性を低下させたモノクローナル抗体を生産する方法が好ましく、その場合、SEMP1抗体の可変領域を、ヒト抗体の定常領域に連結する。

【0030】

また本発明は、診断又は治療、例えば腫瘍治療、血管形成の制御、天然若しくは合成化合物又は細胞を適用するための脳血液関門の制御、炎症反応の制御、眼圧の制御などのための本発明の抗体の使用に関する。この場合、細胞株DSM ACC2458, DSM ACC2459, DSM ACC2461及びDSM ACC2463により分泌される抗体から成る群から選択される抗体を用いることが好ましい。

40

【0031】

本発明の方法により得られる好ましい抗体は、表面に結合しているSEMP1分子、好ましくはSEMP1の細胞外ドメインと結合するので、それらは、生理学的又は病態生理学的な密着結合の発現を定性的又は定量的に検出するために非常に適する。この検出は、周知の通り、免疫学的な測定方法、好ましくはELISA法により行われる。この種の方法は周知である。その場合、本発明の抗体を、標識化及び/又は固定化して、用いることができる。

50

【0032】

その様な診断における免疫学的方法では、検出可能な標識を結合した少なくとも1つの本発明の抗体の結合の後にシグナル変化を評価する。

診断上のSEMP1の重要性は、好ましくは、内皮/上皮細胞層の損傷及び透過性の検出、腫瘍細胞の転移の開始及び/又は進行、並びに腫瘍発生の進行の同定にある。

【0033】

また本発明は、ワクチンのアジュバント透過性を促進し、そしてガン、急性/慢性炎症疾患、心筋虚血、アテローム性硬化症、糖尿病性網膜症、リウマチ様関節炎、腸管感染の治療又は予防処置のための薬物に対する内皮/上皮組織の透過性を増加する方法を提供する。この場合、好ましくはSEMP1の細胞外ドメインに結合する本発明の1又は数個の抗体を、場合により通常の医薬用担体、アジュバント、充填剤又は添加剤と共に投与する。

10

【0034】

治療投与中の免疫応答を予防するために、ヒト由来の抗体にできるだけ類似する抗体を用いることが好ましい(Glassy, M.C., and Dillman, R.O., Mol. Biother. 1 (1988) 7-13)。好ましくは、本発明の抗体のSEMP1結合配列の一部又は全部が、ヒトの可変領域内の対応する配列により置換される様に、本発明の抗体の可変領域が更に修飾された抗体を用いる。その様な抗体は、例えば、キメラ抗体又はヒト化(CDR移植化)抗体である。

【0035】

その様な抗体を、通常、齧歯類のモノクローナル抗体から製造する(Morrison, S.L., Annu. Rev. Immunol. 10 (1992) 239-265; Winter, G., and Milstein, C., Nature 349 (1992) 293-299)。特に好ましい本発明の態様では、腫瘍特異的なヒト抗体(Borrebaeck, C.A.K., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 3995-3999; Borrebaeck, C.A.K., Immunol. Today 9 (1988) 355-359)を治療のために用いる。更に、Griffiths, A.D., et al., EMBO J. 12 (1993) 725-734などの記載通りに、ファージディスプレイライブラリーを介してヒトモノクローナル抗体を調製することが特に好ましい。

20

【0036】

Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition (1989), Cold Spring Harbor, New York及びBerger and Kimmel, Methods in Enzymology, Vol.152, Guide to Molecular Cloning Techniques (1987), Academic Press Inc., San Diego, CAの記載通りに、当業界に既知の方法により配列データに基づいて、本発明のSEMP1抗体を、組換え技術により調製することができる。本発明のポリヌクレオチドを、好ましくは、合成オリゴヌクレオチドから作製する。

30

【0037】

その様な組換えポリペプチドを、当業界に既知の標準的な方法により、真核又は原核宿主細胞において発現させることができる。好ましくは哺乳動物細胞、例えばリンパ細胞株を宿主細胞として用いる。典型的には、そのためのポリヌクレオチド構成体は、本発明の抗体の重鎖及び/又は軽鎖の可変領域を含んで成る完全なヒト抗体の重鎖及び/又は完全なヒト抗体の軽鎖をコードする。

【0038】

代替性のヒトの定常領域配列(重鎖及び/又は軽鎖)が、種々の参考資料から、例えば、限定でなく、E.A. Kabat et al. (1987) (37)に列挙したものから当業者により選択され得る。本発明の一つの態様では、ヒト軽鎖の定常領域のアミノ末端に、本発明の抗体の軽鎖の可変領域がペプチド連結されている(すなわち読み枠を一致させた融合)抗体軽鎖と、それに対応する重鎖とをコードするポリヌクレオチド配列を発現させ、そして重鎖/軽鎖の二量体及び別の抗体タイプを形成させる。

40

【0039】

本発明の方法により得られたモノクローナル抗体は、細胞接着に関与する細胞表面上に結合しているSEMP1抗原に結合するので、それらを、人間のインビボ治療のために用いることができる。従ってまた本発明は、1又は複数の本発明の抗体を、場合により通常の医薬用担体、アジュバント、充填剤又は添加剤と共に含有する医薬組成物を提供する。本発明

50

の当該組成物は、好ましくはワクチンのアジュバント透過性を改善する。

【0040】

治療適用では、1又は複数の本発明の抗体の薬理的有効量を含有する滅菌した当該組成物を、前記疾患の治療のために人間患者に投与する。典型的には当該組成物は、免疫原性を減弱させるために、本発明の抗体のCDR領域を含有するキメラ抗体又はヒト化抗体を含んで成る。

【0041】

非経口投与用の当該組成物は、一般的に、容認される担体、好ましくは水性担体中に溶解した本発明の抗体の溶液を含有する。種々の水性担体、例えば水、緩衝水溶液、0.4%塩水、0.3%グリシン水などを用い得る。この溶液は滅菌され、一般的には粒状物質を含まない。当該組成物を通常の周知の方法により滅菌し得る。

10

【0042】

当該組成物は、医薬上容認される補助物質を含んでよく、それらは、ほぼ生理学的条件にするために必要なものであり、例えばpH調整剤と緩衝剤、毒性調整剤など、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどである。当該組成物中の本発明の抗体の濃度は広く変動し、例えば、重量で約0.01%未満から、通常は少なくとも約0.1%で、多くて5%程度までで変動し、主にその液体の容量、粘度などに基づいて、又は選択した特定の投与様式に従って選択される。

【0043】

従って、典型的な筋肉内注射用医薬組成物は、滅菌緩衝水1mlと、約0.1~250mg、好ましくは1~10mgの本発明の抗体とを含有する。

20

【0044】

前記載通り、本発明の抗体を、組成物、好ましくは非経口投与に適する医薬組成物中に組み込むことができる。好ましくは、0.1~500mg/ml、好ましくは0.1~250mg/mlの抗体を、好ましくは1~500mmol/lの緩衝剤と共に含有する注射可能な緩衝溶液として当該抗体を製剤化する。この注射可能溶液は、液体の剤形でも又は凍結乾燥品の剤形でもよい。

【0045】

この緩衝剤は、例えばL-ヒスチジン（好ましくは1~50mM、最適には5~10mM）でよく、そのpHは5.0~7.0（最適にはpH 6.0）でよい。その他の適当な緩衝剤には、限定でなく、コハク酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム又はリン酸カリウムなどがある。当該溶液の毒性を改良するために、塩化ナトリウムを0~300mM（液体剤形の場合最適には150mM）で用い得る。

30

【0046】

凍結乾燥品の場合、凍結保護剤、主には0~10%のスクロース（最適には0.5~1%）を含有し得る。その他の適当な凍結保護剤にはトレハロース及びラクトースなどがある。凍結乾燥品の場合、増量剤、主には1~10%のマニトールを含有し得る。液体及び凍結乾燥品の両剤形の場合で、安定化剤、主には1~50mMのL-メチオニン（最適には5~10mM）を用い得る。その他の適当な増量剤には、グリシン、アルギニンなどがある。界面活性剤、主には0~0.05%のポリソルベート80（最適には0.005~0.01%）を含有し得る。別の界面活性剤には、限定でなく、ポリソルベート20及びポリオキシエチレンエーテル系界面活性剤、例えばBRIJ（登録商標）などがある。

40

【0047】

医学的治療に適する本発明の抗体の用量は約0.01~50 mg/kg体重であり、この用量を繰り返し投与することができる。

好ましい態様では、当該医薬組成物は、一投与あたり約0.01~10mg/kgの用量の抗体を含有する。より好ましくは1 mg/kgの用量の抗体を含有する。

【0048】

好ましい投与様式は非経口投与（例えば静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内投与）である。好ましい態様では、当該抗体を静脈内点滴又は注射により投与する。別の好ましい態様では、当該抗体を筋肉内又は皮下注射により投与する。

50

【0049】

典型的には、医薬組成物は滅菌され、そして製造及び保存中に安定である必要がある。当該組成物は、溶液、微小乳状液、分散液、リポソーム、又はその他の高濃度薬物に適する整った構造体として製剤化され得る。滅菌注射溶液は、必要量の活性化化合物を、必要な場合には1又は複数の前記列挙した成分と共に適当な溶媒に加え、そして濾過滅菌を行うことにより調製され得る。

【0050】

分散液は、一般的には、活性化化合物を、基礎分散媒体及び前記列挙したその他必要な成分を含有する滅菌担体中に加えることにより調製される。滅菌注射溶液のために滅菌凍結乾燥粉末を調製する場合、その好ましい方法では、濾過滅菌した当該溶液を真空乾燥又は噴霧乾燥して、活性成分と任意の希望成分とから成る粉末を調製する。

10

【0051】

溶液の適当な流動性を、例えばコーティング剤、例えばレシチンの使用により、分散液の場合には必要な粒子サイズを維持することにより、そして界面活性剤の使用により維持することができる。

注射用組成物の吸収延長は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸塩及びオエラチン(oelatin)を組成物中に含有させることにより達成し得る。

【0052】

本発明の抗体及びその部分を、当業界に既知の種々の方法により、多数の治療適用のために投与することができる。好ましい投与経路/様式は、皮下注射、静脈注射又は点滴である。

20

【0053】

ある態様では、当該活性成分を、その化合物の急速な放出を抑制する担体と共に調製することができる。それは、例えば放出制御型製剤、例えば移植体、経皮パッチ、及び微小カプセル式供給系である。生物分解性の生体適合ポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸を用いることができる。その様な製剤の調製方法が多数特許されており、又は当業者に周知である(Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978)。

【0054】

本発明の抗体は、液体、粉末又は凍結乾燥品の形で用いられ、そして適当な希釈剤又は担体、例えば水、塩水、デキストロース水溶液、緩衝水溶液などと共に混合され得る。

30

【0055】

本発明の抗体を、保存のために凍結乾燥し、そして使用前に適当な担体中で再構成することができる。通常の凍結乾燥及び再構成の方法が用いられる。この凍結乾燥と再構成により、生物活性が様々な程度で損失することがあり、それを補償するために使用量を調整する必要がある。

【0056】

いずれの投与経路を選択しても、本発明の抗体を、当業者に周知の通常の方法により医薬上容認される投与剤形に製剤化する。医薬上容認される酸又は塩基付加塩を用いて、抗体を製剤化してもよい。更に、当該化合物又はその塩を、適当な水和型で用いてもよい。

40

【0057】

いずれの投与経路を選択しても、1又は複数の本発明の抗体を、無毒性で且つ治療上有効な量で治療に用いる。種々の要因、例えば患者のタイプ、年齢、体重、性別及び症状、腫瘍の種類、投与経路、並びに治療に用いる抗体の種類に応じて、治療投与様式が選択される。医師が、既知の抗体治療法に照らして当該薬剤の有効量を決定し、処方する。その場合、医師は最初に比較的低用量を用い、それから最大の効果が得られるまで、その用量を増していくだろう。

【0058】

免疫接種における免疫増強(ブースト)のために有用な精製SEMP1ポリペプチドを、真核

50

細胞中で組換え的に生産することができる。SEMP1は、細胞間の接触領域に局在する接着性の強い密着結合タンパク質であるので(Furuse, M., et al., J. Cell Biol. 147 (1999) 891-903)、完全長のポリペプチドを単離及び精製することは非常に難しい。更に、SEMP1は膜結合型タンパク質であるので、膜からタンパク質を解離させることが必要である。

【0059】

種々の界面活性剤(CHAPS, 3-[(3-コラミドプロピル)-ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート; オクチルグルコシド, デオキシコール酸, Igepal(登録商標)CA630, (オクチルフェノキシ)ポリエトキシエタノール; Triton(登録商標)X-100 (オクチルフェノキシ); Thesit, ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル; ジギトニン)による細胞膜からのSEMP1の遊離は失敗した。しかし驚くことに、Zwittergent(登録商標)(N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート, Roche Diagnostics GmbH, DE)によりSEMP1を単離及び精製することができた。

10

【0060】

従って本発明の別の点は、SEMP1ポリペプチドをクロマトグラフィーにより精製する方法である。この方法では、SEMP1ポリペプチドを含有する水性組成物をクロマトグラフィーカラムにかけ、そしてN-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネートの存在下でSEMP1ポリペプチドを溶出し、それをその溶出液から回収する。

【0061】

本発明の別の点は、細胞膜などの基材からSEMP1ポリペプチドを遊離させる方法であり、その方法では、水溶液中の膜結合状態のSEMP1ポリペプチドを、そのポリペプチドが溶解する様にN-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネートにより処理する。

20

【0062】

本発明の抗体を分泌する下記細胞株が、F. Hoffmann-La Roche AGにより2000年5月18日にDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM) (Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany)に寄託された。

細胞株	抗体
DSM ACC2458	モノクローナル抗体(MAB) 抗ヒトSEMP1; クローン3
DSM ACC2459	モノクローナル抗体(MAB) 抗ヒトSEMP1; クローン4
DSM ACC2460	モノクローナル抗体(MAB) 抗ヒトSEMP1; クローン5
DSM ACC2461	モノクローナル抗体(MAB) 抗ヒトSEMP1; クローン7
DSM ACC2462	モノクローナル抗体(MAB) 抗ヒトSEMP1; クローン38
DSM ACC2463	モノクローナル抗体(MAB) 抗ヒトSEMP1; クローン64

30

40

【0063】

前記抗体の特性は以下の通りである。

クローン3: ペプチド21(アミノ酸(aa)97-108, IC1)及び37(aa160-171, EC2)により競合阻害される;

クローン4: ペプチド21(aa97-108, IC1)により競合阻害される;

クローン7: ペプチド5(aa31-42, EC1)により競合阻害される;

クローン64: ペプチド29(aa136-147, EC2), 30(aa139-150, EC2)及び31(aa142-153, EC2)により競合阻害される;

クローン5: ペプチド41(aa191-202, IC2)により競合阻害される;

50

クローン38：ペプチド44(aa200-211, IC2)により競合阻害される。

【0064】

ただし

EC1：細胞外エピトープ1 (aa22-81)；

IC1：細胞内エピトープ1 (aa103-117)；

EC2：細胞外エピトープ2 (aa141-163)；

IC2：細胞内エピトープ2 (aa185-211)。

当該抗体が結合するSEMP1の領域を、SEMP1遺伝子産物のアミノ酸配列上のアミノ酸番号として括弧内に示す。これを、3Dコンピュータ構造予測モデルのシグナルPにより確認した(<http://genome.cbs.dtu.uk/services/SignalP/>)。

10

【0065】

配列番号の説明

配列番号1：融合ペプチド

配列番号2：融合ペプチド

配列番号3：SEMP1のDNA配列

配列番号4：SEMP1ポリペプチドの配列

【0066】

【実施例】

実施例1

細胞培養

20

a) Sf9昆虫細胞

通常の経代培養では、Sf9細胞(ATCC CRL 1711)を、T25フラスコ内で、10%血清(Gibco)、Yeastolate (Gibco)、Pluronic F-68、ゲンタマイシン(Gibco)を補充したIPL41培地(Gibco)中で増殖させた。SEMP1バキュロウイルスを感染させたSf9細胞を大量に単離するために、この細胞を7Lのバッチ発酵槽で培養し、そして接種の3日後に細胞を収集した。

【0067】

b) SEMP1ハイブリドーマ

抗SEMP1抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を、10% FCS, 2mM L-グルタミン(Roche Molecular Biochemicals), 1x 非必須アミノ酸(Biochrom AG), 1mMピルビン酸ナトリウム(Biochrom AG)及びNutridoma (Roche Molecular Biochemicals)を補充したRPMI1640培地中で培養した。抗SEMP1抗体を多量に含む培養上清を得るために、SEMP1ハイブリドーマ株を、Heracus miniPerm classic(MWCO 12.5k)培養装置中で増殖させ、細胞濃度が 1×10^7 /mlに達した後1週間に数回その培地を収集した。

30

【0068】

c) SEMP1レトロウイルスを生ずる細胞株AM12

SEMP1及びI-NGFR(低親和性神経成長因子受容体)(WO 95/06723)を形質導入したレトロウイルス生産性の両種指向性細胞株HSR BM01 (DSM ACC2235, W099/60143)(MoMuLV系)を、10% FCS, 2mM L-グルタミン(Roche Molecular Biochemicals), 1x 非必須アミノ酸(Biochrom AG), 1mMピルビン酸ナトリウム(Biochrom AG)を補充したDMEM培地中で培養した。高力価の上清を得るために、全面密集に近い培養細胞に新鮮な培地を加え、24時間後にその上清を収集し(Machl, A.W., Cytometry 29 (1997) 371-374)、即座にそれを細胞の形質導入のために用いた。

40

【0069】

d) MDA-MB435

SEMP1陰性のヒト乳ガン細胞株MDA-MB435と、SEMP1を形質導入した前記細胞とを、10% FCS, 2mM L-グルタミン(Roche Molecular Biochemicals), 1x 非必須アミノ酸(Biochrom AG), 1mMピルビン酸ナトリウム(Biochrom AG)を補充したRPMI培地中で培養した。レトロウイルスによりSEMP1を形質導入するために、全面密集に近い培養細胞を、実施例1cの記載通りに調製したレトロウイルスを含有する上清と共にインキュベーションした。その培養細胞からFACS(FACS Vantage, Becton Dickinson)により、I-NGFRに対するFITC標識抗体と結

50

合した単一細胞を選別することにより、SEMP1を発現するMDA-MB435細胞株を得た。

【0070】

実施例 2

ベクターの構築とSEMP1の発現

N末端にHis6タグを付加したSEMP1を、標準的な方法に従ってpBlueBacHis2Bベクターによりクローン化した。このHis-SEMP1プラスミドと線状化パキユロウイルスDNAとをSf9細胞にトランスフェクトし、その3日後に上清を集めた(Invitrogen, Bac'NBlue System)。この高力価ウイルス保存液をSf9細胞に27で再度感染させた。感染3日後にその細胞を集め、超音波処理により総タンパク質を抽出した(抽出緩衝液: 50mM NaP, 150mM NaCl, pH 7.2)。そのタンパク質抽出液を30000gで20分間遠心し、そのペレットを50mM NaP, 150mM NaCl, 2% Zwittergent(N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート, 両性イオン性, Roche Molecular Biochemicals)中に溶解した。

10

【0071】

His6タグ付加SEMP1を、前記粗溶解液からNiキレートセファロースカラム(Pharmingen)の親和性クロマトグラフィーにより抽出した。このカラムに300mM NiCl₂を負荷し、平衡化緩衝液(50mM Tris, 500mM NaCl, pH8, 0.5% Zwittergent)で洗浄し、粗タンパク質分画を負荷し、そして平衡化緩衝液/10mMイミダゾールで洗浄した。平衡化緩衝液/200mMイミダゾールで溶出を行った。N末端のHis6タグとエンテロキナーゼタグのために、修飾したSEMP1タンパク質の分子量は23kDから27kDに増加した。

【0072】

20

実施例 3

免疫接種

6~8週齢の雌BALB/cマウスに免疫接種を行った。免疫接種する前に、100μlのカルジオトキシン(10μM/PBS)(LATOXAN, L-8012; Rosans, France)を両足の脛骨筋内に注射して、筋の変性/再生を誘発した(0日目)。シリカゲル膜カラム(Qiagen, DE)により精製した、SEMP1の読み枠を有するプラスミドDNA 50μg/50μl滅菌0.9%NaCl水を、各後脚の前脛骨筋内に注射した。このDNA用量を4週間毎に5回注射した。

【0073】

97日目、すなわち脾臓を取り出す3日前に、眼球穿刺により少量の血清を採取した。血清力価の最も高いマウスを、前記のSf9細胞から精製したSEMP1タンパク質30μgの静脈投与により免疫増強した。129日目にこのマウスから脾臓を取り出し、下記の標準的方法によりハイブリドーマの作製に用いた。SEMP1陽性のハイブリドーマの大量培養からFACSによる細胞選別クローニング(FACS Vantage, Becton Dickinson)により、高生産性のハイブリドーマ株を得た。

30

【0074】

抗SEMP1によるウエスタンブロット分析

Novex NuPage Bis-Tris系(Invitrogen)を用いて標準的な方法に従って、ウエスタンブロット分析を行った。種々の量の精製SEMP1タンパク質、又はSEMP1陽性細胞若しくはSEMP1陰性対照細胞からの抽出タンパク質を分離したゲルを転写したニトロセルロース膜を、SEMP1抗体を生産するハイブリドーマ株由来の上清(1:10及び1:100希釈)とインキュベーションした。抗SEMP1のシグナルを、標準的な化学発光法(Roche Molecular Biochemicals)により検出した。

40

【0075】

実施例 4

免疫蛍光顕微鏡

MDA-MB435細胞を、ポリLリシン(Sigma)で被覆した顕微鏡用スライド上で、標準的な培地中で、種々の密度で培養した。細胞をPBSで洗浄した後、1%パラホルムアルデヒド/PBSにより室温で1時間固定した。0.05% Tween20/10%アルブミン/PBS中で1時間インキュベーションすることにより、透過性の亢進及びブロッキングを行った。その後、抗SEMP1抗体と、次にAlexa488で標識された抗マウスF(ab)₂(Molecular Probes)とにより処理して、

50

間接免疫蛍光染色を行った。

【 0 0 7 6 】

実施例 5

レトロウイルス構成体及びウイルスによる形質導入

レポーター分子としての細胞表面マーカーI-NGFRを有するベクターを用いて、SEMP1レトロウイルスを作製した(Machl, A.W., Cytometry 29 (1997) 371-374)。要約すると、5'-LTRプロモーターが、マーカータンパク質I-NGFRの発現を誘導する。3'下流に位置するSV40プロモーターをCMVプロモーターにより置換し、それによりSEMP1の発現を誘導する。SEMP1遺伝子を、理想的なKozak配列(Kozak, M., Nucleic Acids Res. 15(1987) 8125-8148)を導入したORFとしてクローン化した。

10

【 0 0 7 7 】

感染性のレトロウイルスを生産するために、SEMP1/I-NGFRレトロウイルスプラスミドを、リポフェクタミン(Gibco)により取扱説明書に従って、レトロウイルス生産性の兩種指向性のHSR BM01細胞株にトランスフェクトした。FACSにより細胞選別を行い、そしてそのHSR BM01細胞株の培養上清による有効な形質導入率を検査することにより、高力価なレトロウイルスを生産するHSR BM01細胞株を得た。

この細胞株が生産したレトロウイルスを用いて、例えば腫瘍学的に適当な乳房カルシノーマ細胞に形質導入を行うことにより、抗体特異性及びSEMP1タンパク質の適正な局在化を証明することができる。

【 0 0 7 8 】

20

抗体特異性

種々のモノクローナル抗体のSEMP1特異性を、ウエスタンブロット分析により確認した。代表的な結果を図2に示す(矢印参照; SEMP1ハイブリドーマ株38による)。SEMP1陽性細胞のみ、例えばSAEC(小気管上皮細胞)及びCAC0-2が、予想分子量の約23kDの位置にシグナルを有する。予想通り、造血細胞株K562はSEMP1陰性である。更にSEMP1陰性乳房カルシノーマ細胞株MDAMB435では、SEMP1タンパク質バンドは認められず、一方レトロウイルスにより形質導入した前記細胞株MDAMB435xSemp1では、強いSEMP1のバンドが認められた。

【 0 0 7 9 】

SEMP1ハイブリドーマ株38以外にも、SEMP1の種々の細胞内及び細胞外エピトープに対するモノクローナル抗体を生産する種々のSEMP1ハイブリドーマ株が得られた。

30

図3は、細胞におけるSEMP1抗体の結合特異性を示す。4回膜貫通型タンパク質であるSEMP1は、細胞間の接触部位にのみ局在する(矢印参照; SEMP1ハイブリドーマ株38による)。

【 0 0 8 0 】

実施例 6

補完的なSEMP1抗体によるエピトープのマッピング

下記の手順に従ってELISAによりSEMP1抗体のエピトープを選別した。

Hisタグ付加SEMP1による96ウエルプレートのコーティング;

1%ウシアルブミンによるプレートのブロッキング;

洗浄(PBS/0.05%Tween20により2回);

40

抗SEMP1活性を有するハイブリドーマ血清とのインキュベーション、ポジティブコントロールとして抗His抗体とのインキュベーション;

洗浄;

ペルオキシダーゼ結合二次抗体とのインキュベーション;

洗浄;

ペルオキシダーゼ基質(ABTS溶液)とのインキュベーション。

【 0 0 8 1 】

66個の異なる抗体のエピトープを同定するために、補完的なペプチドを用いてELISAを行った。そのために、SEMP1の親水性領域に由来する44個のペプチドを合成し、そして各反応毎に抗SEMP1抗体を含む上清とインキュベーションした。多量のペプチドを用いること

50

により、そのペプチドがエピトープに相当した場合、抗SEMP1抗体とHisタグ付加SEMP1との結合が低下する。

その発色シグナルの低下を、ペプチドとインキュベーションしていない上清の場合と比較して測定した。

【0082】

実施例 7

SEMP1ペプチドを免疫接種することによるSEMP1抗体作製の試み

融合ペプチド(QWRIYSAGD)-KLH (テンガイヘモシアニンに結合した配列番号1のペプチド)及びKLH-(MKCMKCLEDEMCKM) (テンガイヘモシアニンに結合した配列番号2のペプチド)を、フロイントアジュバントと共に、2匹のウサギに注射した。免疫接種1回につき合計0.1mgのペプチドを3カ所の皮下に注射した。0, 2, 6及び8週目に注射を行った。ドットプロット上では前記ペプチドに対して、血清は高い抗体力価を示したが、細胞抽出物に対して又はFACS分析において、この血清は機能しなかった。

【0083】

実施例 8

ELISAの原理に基づく酵素免疫検査によるSEMP1の測定

試薬 1 :

1.25 µg/mlピオチニル化モノクローナル抗体クローン3 (Peters, J.H., et al., "Monoklonale Antikörper", Springer Verlag, Berlin, 1985, pp.209-212に基づいて調製した);
10mmol/lクエン酸緩衝剤;

47mmol/lリン酸緩衝剤、pH6.3;

50mU/mlのペルオキシダーゼ連結モノクローナル抗体クローン5 (Wilson, M.B., and Nakane, P.K., 1978, in Immunofluorescence and Related Staining Techniques, W. Knapp, K. Kolubar, G. Wick eds., pp.215-224, Elsevier/North Holland, Amsterdamに基づいて調製した; この活性はペルオキシダーゼによる)。

【0084】

試薬 2 :

100mmol/lリン酸 - クエン酸緩衝剤、pH4.4;

3.2mmol/l過ホウ酸ナトリウム;

1.9mmol/l ABTS(2,2-アジノ-ジ-(3-エチル-ベンズチアゾリン-6-スルホン酸塩))。

各々3, 5, 10及び25ng/mlの組換えSEMP1を加えたヒト血清を試料として用いる。

ストレプトアビジンで被覆されたポリスチレン製小チューブ(EP-A0269092に基づいて調製した)を用いて反応を行う。

【0085】

測定方法 :

前記小チューブ内で0.2mlの試料と1mlの試薬1とを20~25℃で60分間インキュベーションした後、その溶液を吸引し、そして水道水で2回洗浄する。次に試薬2を加え、20~25℃で30分間インキュベーションし、そして420nmの吸光度を光度計で測定する。この様にして標準曲線を得て、それにより検査試料中のSEMP1濃度を決定する。

【0086】

実施例 9

正常組織及び腫瘍組織におけるSEMP1の検出

組織学的切片上のSEMP1タンパク質を検出するために、正常組織及び乳ガン組織のパラフィン切片を調べた。図5は、抗SEMP1抗体(図5A, B)により、そして対照として非結合性抗体(C, D)により染色した切片を示す。本発明の抗SEMP1抗体は、種々の腺構造の上皮細胞のみに特異的に結合しているが、周囲の間葉性支質組織は染色されていない。

【0087】

図5から明らかに、全ての上皮細胞においてその膜が染色されていることが示される。この図では、乳腺の切片において、小葉構造(上皮細胞)とは別に、管構造(内皮細胞)も本発明の抗体により染色され得ることは示されていない。

10

20

30

40

50

【0088】

これとは対照的に、腫瘍組織におけるSEMP1の発現は、正常組織に比べて有意に低い。このことが図6及び7に示されている。乳房又は結腸の正常組織では、SEMP1はその上皮細胞の膜部分に特に認められ、一方腫瘍組織では、その膜及び細胞質にいくらかの染色が認められた。しかし腫瘍組織の染色は、正常組織に比べてかなり低かった。

【0089】

図7は、正常な乳房組織の1つの切片と乳房腫瘍組織の8つの切片との比較を示す。図7では、特に小葉構造が染色されている。いずれの場合も、それらの膜に染色が認められる。乳房腫瘍組織の切片のいずれでも、膜の染色を検出することはできなかったが、正常乳房組織ではそれが認められた。乳房腫瘍組織では、常に細胞質が薄く均一に染色されている。

10

【0090】

これらの実験から、本発明の抗SEMP1抗体は、細胞間の密着結合状態を診断するために有効に用いられること、従ってこれは腫瘍発生及び/又は腫瘍進行のための貴重なマーカーとなることが証明される。

【0091】

引用文献

【表1】

- Barry, M.A., et al., *Biotechniques* 16 (1994) 616-618 and 620
- Bessler, W.G., et al., *Immunobiol.* 170 (1985) 239-244
- Bird, R.E., et al., *Science* 242 (1988) 423-426
- Borrebaeck, C.A.K., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 3995-3999
- Borrebaeck, C.A.K., *Immunol. Today* 9 (1988) 355-359
- Chochand-Prillet, B., et al., *Ultrastruct. Pathol.* 22 (1998) 413-420
- Cianfriglia, M., et al., *Hybridoma* 2 (1993) 451-457
- Davis, H.L., *Curr. Opin. Biotechnol.* 8 (1997) 635-646 10
- Davis, H.L., et al., *Hum. Mol. Genet.* 2 (1993) 1847-1851
- Davis, H.L., et al., *Vaccine* 12 (1994) 1503-1509
- E. Harlow and D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)
- EP-A 0 269 092
- Furuse, M., et al., *J. Cell Biol.* 141 (1998) 1539-1550
- Furuse, M., et al., *J. Cell Biol.* 143 (1998) 391-401
- Furuse, M., et al., *J. Cell Biol.* 147 (1999) 891-903
- Glassy, M.C., and Dillman, R.O., *Mol. Biother.* 1 (1988) 7-13 20
- Griffiths, A.D., et al., *EMBO J.* 12 (1993) 725-734
- Harlow E. and Lane D., "Antibodies - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory (1988)
- Hood et al., *Immunology*, Benjamin N.Y., 2nd edition (1984)
- Houston et al., *PNAS USA* 85 (1988) 5879-5883
- Hunkapiller, T., and Hood, L., *Nature* 323 (1986) 15-16
- Introduction to Protein Structure*, C. Brandon and J. Tooze, Garland Publishing, New York (1981)
- Jung, G., et al., *Angewandte Chemie* 97 (1985) 883-885
- Kozak, M., *Nucleic Acids Res.* 15 (1987) 8125-8148 30
- Lowrie, D.B., *Nat. Med.* 4 (1998) 147-148
- Machl, A.W., *Cytometry* 29 (1997) 371-374
- Morrison, S.L., *Annu. Rev. Immunol.* 10 (1992) 239-265
- Peters, J.H., et al., "Monoklonale Antikörper", Springer Verlag, Berlin, 1985, pp. 209-212
- Porvaznik, M., et al., *J. Supramol. Struct.* 10 (1979) 13-30
- Proteins, Structures and Molecular Principles*, Creighton (editor), W.H. Freeman and Company, New York (1984)
- Rothman, P., et al., *Mol. Cell. Biol.* 10 (1990) 1672-1679

- Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition (1989), Cold Spring Harbor, New York
- Soler, A.P., et al., *Carcinogenesis* 20 (1999) 1425-1431
- Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978
- Swift, J.G., et al., *J. Submicrosc. Cytol.* 15 (1983) 799-810
- Swisshelm, K.A., et al., *Gene* 226 (1999) 285-295
- Thornton, J.M., et al., *Nature* 354 (1991) 105-106 10
- Ulivieri, C., et al., *J. Biotechnol.* 51 (1996) 191-194
- Wilson, M.B., and Nakane, P.K., 1978, in *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*, W. Knapp, K. Kolubar, G. Wick eds., pp. 215-224, Elsevier/North Holland, Amsterdam
- Winter, G., and Milstein, C., *Nature* 349 (1991) 293-299
- WO 95/06723
- WO 99/00010
- WO 99/60143
- Woo, P.L., et al., *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 32818-32828 20

【 0 0 9 2 】

【 配列表 】

SEQUENCE LISTING

- <110> F. Hoffmann-La Roche
 <120> Antibodies against SEMP1, methods for their production
 and uses thereof
 <130> B015943
 <140>
 <141> 10
 <150> EP00113344.6
 <151> 2000-06-23
 <150> EP01107799.7
 <151> 2001-04-05
 <160> 4
 <210> 1
 <211> 9 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:peptide
 <400> 1
 Gln Trp Arg Ile Tyr Ser Ala Gly Asp
 1 5 30
 <210> 2
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:peptide
 <400> 2 40
 Met Lys Cys Met Lys Cys Leu Glu Asp Asp Glu Met Gln Lys Met

1	5	10	15		
⟨210⟩ 3					
⟨211⟩ 3443					
⟨212⟩ DNA					
⟨213⟩ Homo sapiens					
⟨220⟩					
⟨221⟩ CDS					
⟨222⟩ (221)..(853)					
⟨400⟩ 3					
gagcaaccctc	agcttctagt	atccagactc	cagcgcgcgc	ccgggcgcgg	accccaaccc 60
cgaccagag	ctctccagc	ggcggcgcag	cgagcagggc	tccccgccit	aacttctcc 120
gcggggccca	gccaccttcg	ggagtcggg	ttgcccacct	gcaaactctc	cgcttctgc 180
accigccacc	ctgagccag	cgcgggcgcc	cgagcgagtc	atg gcc aac gcg ggg	235
				Met Ala Asn Ala Gly	20
				1 5	
ctg cag ctg	ttg ggc ttc	att ctc gcc	ttc ctg gga	tgg atc ggc	gcc 283
Leu Gln Leu	Leu Gly Phe	Ile Leu Ala	Phe Leu Gly	Trp Ile Gly	Ala
	10	15	20		
atc gtc agc	act gcc ctg	ccc cag tgg	agg att tac	tcc tat gcc	ggc 331
Ile Val Ser	Thr Ala Leu	Pro Gln Trp	Arg Ile Tyr	Ser Tyr Ala	Gly
	25	30	35		30
gac aac atc	gtg acc gcc	cag gcc atg	tac gag ggg	ctg tgg atg	tcc 379
Asp Asn Ile	Val Thr Ala	Gln Ala Met	Tyr Glu Gly	Leu Trp Met	Ser
	40	45	50		
tgc gtg tgc	cag agc acc	ggg cag atc	cag tgc aaa	gtc ttt gac	tcc 427
Cys Val Ser	Gln Ser Thr	Gly Gln Ile	Gln Cys Lys	Val Phe Asp	Ser
	55	60	65		
ttg ctg aat	ctg agc agc	aca ttg caa	gca acc cgt	gcc ttg atg	gtg 475
Leu Leu Asn	Leu Ser Ser	Thr Leu Gln	Ala Thr Arg	Ala Leu Met	Val
					40

70	75	80	85		
gtt ggc atc ctc ctg gga gtg ata gca atc ttt gtg gcc acc gtt ggc	523				
Val Gly Ile Leu Leu Gly Val Ile Ala Ile Phe Val Ala Thr Val Gly					
90	95	100			
atg aag tgt atg aag tgc ttg gaa gac gat gag gtg cag aag atg agg	571				
Met Lys Cys Met Lys Cys Leu Glu Asp Asp Glu Val Gln Lys Met Arg					
105	110	115			10
atg gct gtc att ggg ggt gcg ata ttt ctt ctt gca ggt ctg gct att	619				
Met Ala Val Ile Gly Gly Ala Ile Phe Leu Leu Ala Gly Leu Ala Ile					
120	125	130			
tta gtt gcc aca gca tgg tat ggc aat aga atc gtt caa gaa ttc tat	667				
Leu Val Ala Thr Ala Trp Tyr Gly Asn Arg Ile Val Gln Glu Phe Tyr					
135	140	145			
gac cct atg acc cca gtc aat gcc agg tac gaa ttt ggt cag gct ctc	715				20
Asp Pro Met Thr Pro Val Asn Ala Arg Tyr Glu Phe Gly Gln Ala Leu					
150	155	160	165		
ttc act ggc tgg gct gct gct tct ctc tgc ctt ctg gga ggt gcc cta	763				
Phe Thr Gly Trp Ala Ala Ala Ser Leu Cys Leu Leu Gly Gly Ala Leu					
170	175	180			
ctt tgc tgt tcc tgt ccc cga aaa aca acc tct tac cca aca cca agg	811				
Leu Cys Cys Ser Cys Pro Arg Lys Thr Thr Ser Tyr Pro Thr Pro Arg					30
185	190	195			
ccc tat cca aaa cct gca cct tcc agc ggg aaa gac tac gtg	853				
Pro Tyr Pro Lys Pro Ala Pro Ser Ser Gly Lys Asp Tyr Val					
200	205	210			
tgacacagag gcaaaaggag aaaatcatgt tgaacaaac cgaaaatgga cattgagata	913				
ctatcattaa cattaggacc ttagaatttt gggatttgta atctgaagta tggattaca	973				
aaacaaacaa acaaacaaaa aacctatgtg ttaaaatact cagtgcataa catggcttaa	1033				40
tcttatttta tcttctttcc tcaatatagg agggaagatt ttaccatttg tattactgct	1093				

tccattgag taatcatact caaatggggg aaggggtgct ccttaaata atagatat 1153
 gtatafatac atgtttttct attaaaaata gacagtaaaa tactattctc attatgttga 1213
 tactagcata cttaaataat ctctaaaata ggtaaagtga tttaatcca tattgatgaa 1273
 gatgtttatt ggtatatttt cttttctgct cttatataca tatgtaacag tcaaatatca 1333
 ttactcttc ttcatlagct ttgggtgctt ttgccacaag acctagccta atttaccaag 1393
 gatgaattct ttcaattctt catgctgctc ctttccatat acttatttta tttttacca 1453
 taatcttata gcacttgcct cgttattaag ccttatttg ttttggtttt cattggcttc 1513 10
 tatctctga atctaacaca ttccatagcc tacattttag ttctaaagc caagaagaat 1573
 ttattacaaa tcagaacttt ggaggcaaat cttctgcat gaccaaagt ataaattcct 1633
 gttgaccttc ccacacaatc cctgtactct gacctatagc actcttgitt gctttgaaaa 1693
 tatttgcca attgagtgc tgcatgctgt tccccagggt gttgtaacac aactttattg 1753
 attgaatttt taagctactt attcatagtt ttatateccc ctaaactacc tttttgttcc 1813
 ccattcctta attgtattgt ttcccagaat gtaattatca tgcgttttat atcttccata 1873
 taagggtggtg tctgtttgtc tgaacaaaagt gctagacttt ctggagtgat aatctgggtga 1933 20
 caaatattct ctctgtagct gtaagcaagt cacttaatct ttctacctct tttttctatc 1993
 tgccaaattg agataatgat acttaaccag ttagaagagg tagtgigaat attaattagt 2053
 ttatattact ctattcttt gaacatgaac tatgcctatg tagtgccttt atttgctcag 2113
 ctggctgaga cactgaagaa gtcactgaac aaaacctaca cacgtacctt catgtgattc 2173
 actgcttcc tctctctacc agtctatttc cactgaacaa aacctacaca cataccttca 2233
 tgtggttcag tgccttctc tctctaccag tctatttcca ctgaacaaaa cctacgcaca 2293
 tacttcatg tggctcagtg ccttctctc tctaccagtc tatttccatt ctttcagctg 2353 30
 tgtctgacat gtttgtgctc tgttccattt taacaactgc tcttactttt ccagtctgta 2413
 cagaatgcta tttcacttga gcaagatgat gtatggaaag ggtgttggca ctgggtctctg 2473
 gagacctgga tttgagtctt ggtgctatca atcaccgtct gtgtttgagc aaggcatttg 2533
 gctgctgtaa gcttattgct tcatctgtaa gcgggtggttt gtaattcctg atcttcccac 2593
 ctccacagta tgttgtgggg atccagtgag atagaatata tgaagtgtg gttttgtaat 2653
 ttgaaaagtg ctatactaag ggaaagaatt gaggaattaa ctgcatacgt ttgggtgttg 2713
 cttttcaaat gtttgaanaa aaaaaaatgt taagaaatgg gtttcttggc ttaaccagtc 2773 40
 tctcaagiga tgagacagtg aagtaaaatt gagtgcacta aacgaataag attctgagga 2833

agtcttatct tctgcagtga gtatggccca atgcittctg tggctaaaca gatgtaatgg 2893
 gaagaaataa aagcctacgt gttggtaa at ccaacagcaa gggagatttt tgaatcataa 2953
 taactcataa ggtgctatct gttcagtgat gccctcagag ctccttgctgt tagctggcag 3013
 ctgacgcctgc taggatagtt agtttggaaa tggctacttca taataaacta cacaaggaaa 3073
 gtcagccacc gtgtcttatg aggaattgga cctaataaat tttagtgctgc ctcccaaacc 3133
 tgagaatata tgccttttggga agttaaaatt taaatggctt ttgccacata catagatctt 3193
 catgatgigt gagtghtaatt ccatgtggat atcagttacc aacattaca aaaaaatttt 3253
 atggcccaaa atgaccaacg aaattgttac aatagaattt atccaatttt gatcttttta 3313
 tattcttcta ccacacctgg aaacagacca atagacattt tggggtttta taatgggaat 3373
 ttgtataaag cattactctt tttcaataaa ttgtttttta atttaaaaaa aggaaaaaaa 3433
 aaaaaaaaaa 3443

<210> 4

<211> 211

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Asn Ala Gly Leu Gln Leu Leu Gly Phe Ile Leu Ala Phe Leu
 1 5 10 15
 Gly Trp Ile Gly Ala Ile Val Ser Thr Ala Leu Pro Gln Trp Arg Ile
 20 25 30
 Tyr Ser Tyr Ala Gly Asp Asn Ile Val Thr Ala Gln Ala Met Tyr Glu
 35 40 45
 Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Ser Gln Ser Thr Gly Gln Ile Gln Cys
 50 55 60
 Lys Val Phe Asp Ser Leu Leu Asn Leu Ser Ser Thr Leu Gln Ala Thr
 65 70 75 80
 Arg Ala Leu Met Val Val Gly Ile Leu Leu Gly Val Ile Ala Ile Phe
 85 90 95
 Val Ala Thr Val Gly Met Lys Cys Met Lys Cys Leu Glu Asp Asp Glu

10

20

30

40

100	105	110	
Val Gln Lys Met Arg Met Ala Val Ile Gly Gly Ala Ile Phe Leu Leu			
115	120	125	
Ala Gly Leu Ala Ile Leu Val Ala Thr Ala Trp Tyr Gly Asn Arg Ile			
130	135	140	
Val Gln Glu Phe Tyr Asp Pro Met Thr Pro Val Asn Ala Arg Tyr Glu			
145	150	155	10
Phe Gly Gln Ala Leu Phe Thr Gly Trp Ala Ala Ala Ser Leu Cys Leu			
165	170	175	
Leu Gly Gly Ala Leu Leu Cys Cys Ser Cys Pro Arg Lys Thr Thr Ser			
180	185	190	
Tyr Pro Thr Pro Arg Pro Tyr Pro Lys Pro Ala Pro Ser Ser Gly Lys			
195	200	205	
Asp Tyr Val			20
210			

【図面の簡単な説明】

【図1】図1：SEMP1タンパク質の精製。SEMP1-バキュロウイルスを感染させたSf9昆虫細胞(Research Diagnostic Inc., NJ, USA)で、Hisタグ付加SEMP1を発現させた。Sf9細胞の溶解液の粗上清から、NiキレートカラムによりHisタグ付加SEMP1を精製した。200mMイミダゾールで溶出することにより、最高の収量及び純度が得られた。矢印は、Hisタグ付加SEMP1タンパク質の位置を示す。

【図2】図2：抗体の特異性及び細胞依存的なSEMP1の発現。ウエスタンブロット法による抗SEMP1モノクローナル抗体の特異性の分析。SEMP1陰性細胞(造血細胞株K562、乳ガン細胞株MDA-MB435)、及び陽性細胞(SAEC(小気管上皮細胞)、アデノカルシノーマCACO-2、SEMP1レトロウイルスにより形質導入した乳ガン細胞MDA-MB435)を全面密集に成るまで増殖させ、溶解し、そしてウエスタンブロット分析した。矢印は、天然のSEMP1タンパク質の位置を示す。

【図3】図3：乳ガン細胞におけるSEMP1の発現。バルク培養した、SEMP1を形質導入したMDA-MB435細胞におけるSEMP1の発現を、蛍光顕微鏡により分析した。S字状のSEMP1染色パターンから、その発現の特異性及び細胞間接触部位への局在化が示される。

【図4】図4：SEMP1のドメイン構造、及びSEMP1のモノクローナル抗体5のエピトープマッピング。配列番号4のアミノ酸(aa)22-81は第一細胞外ドメイン(EC1)であり、aa 103-17は第一細胞内ドメイン(IC1)であり、aa 141-163は第二細胞外ドメイン(EC2)であり、aa 185-211はC末端の細胞内ドメイン(IC2)である。aa 1-21(N末端)、82-102、118-140及び164-184は膜ドメインである。

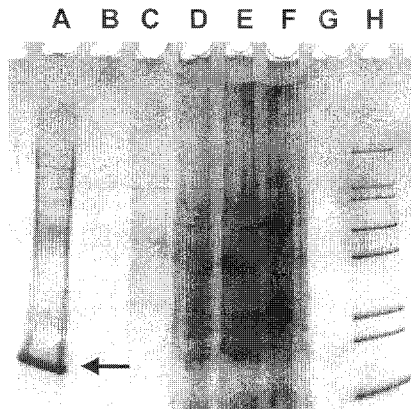
【図5】図5：正常なヒト乳房組織におけるSEMP1タンパク質の発現。SEMP1タンパク質を抗SEMP1/抗マウスPODにより染色し、そしてカウンター染色をヘマトキシリンにより行った(パネルA及びB)。二次抗体の抗マウスPODによるコントロール染色をパネルC及びDに示す。パネルA及びC内の四角の枠は、パネルB及びDにおいて拡大した領域を示す。

【図6】図6：正常な乳房組織及び結腸組織と、乳房及び結腸の腫瘍組織とのSEMP1発現の比較。図5の記載通りに染色した。

【図7】図7：異なる被験者の種々の乳房腫瘍組織と、正常乳房組織とのSEMP1染色の比較。図5の記載通りに染色した。

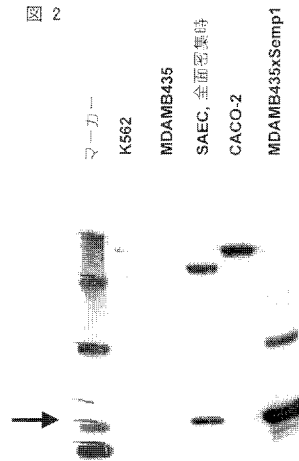
【図1】

図1



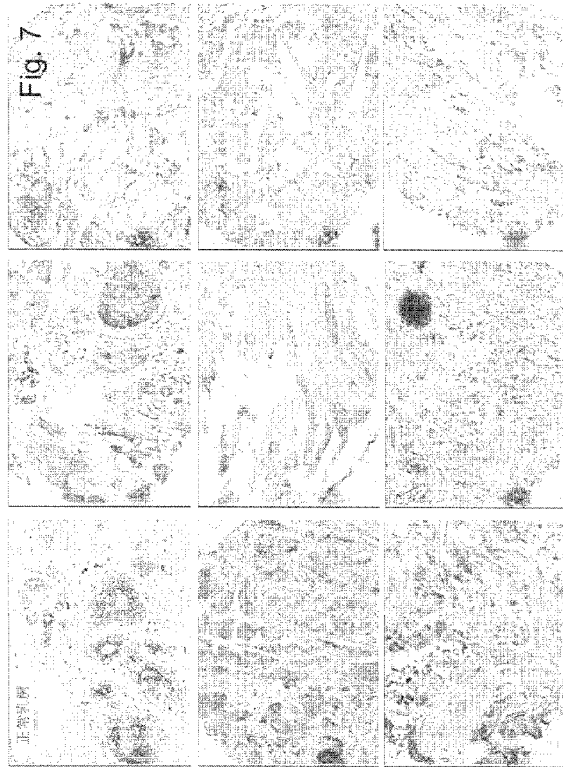
【図2】

図2



【 図 7 】

図 7



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P	9/14
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P	27/06
C 1 2 N 5/10	A 6 1 P	29/00
// G 0 1 N 33/53	A 6 1 P	35/00
	A 6 1 P	43/00 1 0 1
	A 6 1 P	43/00 1 0 5
	C 1 2 N	5/00 B
	G 0 1 N	33/53 D

微生物の受託番号 DSM ACC2462

微生物の受託番号 DSM ACC2463

(74)代理人 100081330

弁理士 樋口 外治

(72)発明者 トルステン ホエベル

ドイツ連邦共和国, デー - 8 1 5 4 3 ミュンヘン, フライバトシュトラッセ 1

(72)発明者 ステファン コッホ

ドイツ連邦共和国, デー - 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ランゴナー シュトラッセ 1 8

(72)発明者 マンフレット クビース

ドイツ連邦共和国, デー - 8 2 3 7 7 ペンツベルク, グラスバントシュトラッセ 7 ツェー

(72)発明者 オーラフ ミュンディグル

ドイツ連邦共和国, デー - 8 2 3 9 8 ポリンク, オベルミュールシュトラッセ 9

(72)発明者 ペトラ ルーガー

ドイツ連邦共和国, デー - 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ビルケンシュトラッセ 1 3

審査官 三原 健治

(56)参考文献 Gene, Vol.226(1999), p.285-295

BioTechniques, Vol.16, No.4(1994), p.616-618, 620

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B名)

C07K 16/00-16/46

JSTPlus(JOIS)

BIOSIS/WPI(DIALOG)

PubMed

专利名称(译)	抗SEMP 1抗体，其制备方法和用途		
公开(公告)号	JP3542784B2	公开(公告)日	2004-07-14
申请号	JP2001191790	申请日	2001-06-25
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
当前申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	トルステンホエベル ステファンコツホ マンフレットクビース オーラフミュンディグル ペトラルーガー		
发明人	トルステン ホエベル ステファン コツホ マンフレット クビース オーラフ ミュンディグル ペトラ ルーガー		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61P9/14 A61P27/06 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K16/18 C07K16/28 C12N5/10		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P27/06 A61P29/00 C07K16/18 C07K16/28 C07K2317/34 C12N2799/026 C12N2799/027		
FI分类号	C07K16/18.ZNA A61K39/395.D A61K39/395.E A61K39/395.H A61K39/395.T A61P9/14 A61P27/06 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00.101 A61P43/00.105 C12N5/00.B G01N33/53.D C12N5/00.102 C12N5/16		
F-TERM分类号	4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB04 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/CC03 4C085/DD21 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	石田 敬 西山雅也		
审查员(译)	三原贤治		
优先权	2000113344 2000-06-23 EP 2001107799 2001-04-05 EP		
其他公开文献	JP2002332300A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供用于检查紧密结合蛋白的缺失或表达的抗体，用于诊断肿瘤的发生和/或进展或肿瘤的治疗。解决方案：提供了用于癌症的诊断和治疗以及与紧密结合蛋白质SEMP1结合的抗体。抗体以与选自抗体DSM ACC2458，DSM ACC2459，DSM ACC2461和DSM ACC2463的抗体相当的方式与SEMP1结合。

