

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-280607

(P2009-280607A)

(43) 公開日 平成21年12月3日(2009.12.3)

| (51) Int.Cl.                 | F I            | テーマコード (参考) |
|------------------------------|----------------|-------------|
| <b>C07K 16/18 (2006.01)</b>  | C07K 16/18 ZNA | 4B024       |
| <b>C12N 15/09 (2006.01)</b>  | C12N 15/00 A   | 4C085       |
| <b>A61K 39/395 (2006.01)</b> | A61K 39/395 D  | 4H045       |
| <b>A61P 35/00 (2006.01)</b>  | A61K 39/395 N  |             |
| <b>A61P 9/00 (2006.01)</b>   | A61P 35/00     |             |

審査請求 有 請求項の数 25 O L (全 33 頁) 最終頁に続く

|              |                              |          |                     |
|--------------|------------------------------|----------|---------------------|
| (21) 出願番号    | 特願2009-191668 (P2009-191668) | (71) 出願人 | 500516090           |
| (22) 出願日     | 平成21年8月21日 (2009. 8. 21)     |          | アイドゲネジィッヒェ テヒニツシェ ホ |
| (62) 分割の表示   | 特願2000-548372 (P2000-548372) |          | フシューレ ツリッヒ          |
| 原出願日         | 平成11年5月11日 (1999. 5. 11)     |          | スイス国、ツェーハー—8092 ツリッ |
| (31) 優先権主張番号 | 09/075, 338                  | (74) 代理人 | 100065385           |
| (32) 優先日     | 平成10年5月11日 (1998. 5. 11)     |          | 弁理士 山下 穰平           |
| (33) 優先権主張国  | 米国 (US)                      | (72) 発明者 | ネリ・ダリオ              |
| (31) 優先権主張番号 | 09/300, 425                  |          | スイス国、ツェーハー—8049 ツリッ |
| (32) 優先日     | 平成11年4月28日 (1999. 4. 28)     |          | ヒ、インビスピュールスタイヒ 22   |
| (33) 優先権主張国  | 米国 (US)                      | (72) 発明者 | タレリ・ロレンゾ            |
|              |                              |          | イタリア国、53035 モンテリッジオ |
|              |                              |          | ニ、ヴィア アバッディア 20     |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フィブロネクチンのED-Bドメインに対する抗体、それを含有する抱合体、および、腫瘍および血管新生関連の疾病の診断および治療をするためのその用途

(57) 【要約】

【課題】 フィブロネクチンのED-Bドメインに特異的な、サブナノモルの解離定数を有する抗体を生成することにある。

【解決手段】 本発明は、フィブロネクチンのED-Bドメインの特性エピトープ即ち、血管新生のマーカーに特異的なサブナノモルの親和性を有する抗体に関する。更に、それは、新形成血管をインビボで検出するための放射線標識化高親和性抗ED-B抗体の用途と、前記抗体を備える診断キットとに関する。更にまた、それは、上記抗体並びに好適な光活性分子（例えば、妥当に選択された光増感剤）を備える抱合体と、新血管の選択的に光伸介された閉塞に対する用途に関する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

フィブロネクチンの E D - B ドメインの特性エピトープに対する特異的親和性を有する抗体であって、前記 E D - B ドメインに対するサブナノモル範囲の親和性を有することを特徴とする抗体。

## 【請求項 2】

前記抗体は、E D - B ( + ) フィブロネクチンを認識するものである請求項 1 の抗体。

## 【請求項 3】

前記抗体は、s c F v 型である請求項 1 の抗体。

## 【請求項 4】

前記抗体は、組換え抗体である請求項 3 の抗体。

## 【請求項 5】

前記抗体は、フィブロネクチンの E D - B ドメインを 5 4 p M の K d で結合させるものである請求項 1 の抗体。

## 【請求項 6】

以下のアミノ酸配列：

V H

EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS  
SFSMSWVRQA PGKGLEWVSS ISGSSGTTY  
ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED  
TAVYYCAKPF PYFDYWGQGT LVTVSS

(SEQ ID NO:19)

リンカー

GDGSSGGSGGASTG

(SEQ ID NO:20)

V L

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS  
SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY YASSRATGIP  
DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ  
QTGRIPPTFG QGTKVEIK

(SEQ ID NO:21)

を有する請求項 1 の抗体。

## 【請求項 7】

前記抗体は、L 1 9 の機能的に等価な変異体形態であって、

該 L 1 9 は、配列番号 1 9、2 0 及び 2 1 のアミノ酸配列を有する請求項 1 の抗体。

## 【請求項 8】

前記抗体は、放射線標識化されたものである請求項 7 の抗体。

## 【請求項 9】

前記抗体は、放射線ヨウ素化されたものである請求項 8 の抗体。

## 【請求項 1 0】

血管新生のマーカーを迅速に標的化する方法に使用するための請求項 1 乃至 9 のいずれか一項に記載の抗体。

## 【請求項 1 1】

血管新生の免疫シンチグラフィー検出のための請求項 1 0 に記載された抗体。

## 【請求項 1 2】

血管増殖によって特徴付けられる疾病を検出するための請求項 1 1 に記載された抗体。

## 【請求項 1 3】

前記疾病は、糖尿病性網膜症、加齢黄斑変性症または腫瘍である請求項 1 2 に記載された抗体。

## 【請求項 1 4】

10

20

30

40

50

前記抗体は、その注入後 3 ~ 4 時間、それぞれの組織に局在化するものである請求項 10 に記載された抗体。

【請求項 15】

前記抗体は、その注入後 3 時間、それぞれの組織に局在化するものである請求項 10 に記載された抗体。

【請求項 16】

請求項 1 乃至 9 のいずれか一項に記載の抗体と、ドメイン血管新生を検出するために必要な 1 以上の試薬とを備えることを特徴とする診断キット。

【請求項 17】

血管増殖によって特徴付けられる腫瘍および疾病の診断および治療をするための請求項 1 乃至 9 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 18】

請求項 1 の抗体と、血液凝固および血管閉塞を導入可能な分子とを備えることを特徴とする抱合体。

【請求項 19】

前記血液凝固および血管閉塞を導入可能な分子は、光活性分子である請求項 18 の抱合体。

【請求項 20】

前記光活性分子は、光増感剤である請求項 19 の抱合体。

【請求項 21】

前記光増感剤は、600nm以上の波長を吸収するものである請求項 20 の抱合体。

【請求項 22】

前記光増感剤は、スズ(IV)クロリン<sub>6</sub>の誘導体である請求項 21 の抱合体。

【請求項 23】

血管新生に関連した病状の処置用に注入可能な組成物の調製に使用するための、請求項 18 の抱合体。

【請求項 24】

前記血管新生に関連した病状は、眼球血管新生により、または眼球血管新生に関連して引き起こされるものである請求項 23 の抱合体。

【請求項 25】

前記抗体は、配列番号 19 に記載の V H ドメインを有することを特徴とする請求項 1 に記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、フィブロネクチンの ED - B ドメインの特性エピトープ、即ち血管新生のマーカーに特異的なサブナノモルの親和性を有する抗体に関する。それはまた、新形成血管をインビボで検出するための、放射線標識化された高親和性の抗 ED - B 抗体の用途と、前記抗体を備える診断キットとに関する。

【0002】

更に、本発明は、上記抗体および好適な光活性分子(例えば、光増感剤)を備える抱合体と、新血管の検出および/または凝固へのそれらの用途に関する。

【背景技術】

【0003】

腫瘍は、新血管の形成(血管新生)なくして、一定の塊以上に成長することはできない。また、微細血管密度と腫瘍侵襲性との間の相関が、多数の腫瘍について報告されている(Folkman (1995), Nature Med., 1, 27-31)。更に、血管新生は、視力を失わせる眼球不調の大半の基礎となる[Lee et al., Surv. Ophthalmol. 43, 245-269 (1998); Friedlander, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 9764-9769 (1996)]。血管新生のマーカーを選択的に標的化できる分子は、腫瘍や、血管増殖によって特徴付けられる他の疾

10

20

30

40

50

病、例えば糖尿病性網膜症や、加齢黄斑変性症の診断および治療用の診療的機会を創生する。血管新生のマーカーは、積極的な固形腫瘍の大半で発現され、そして静脈注射された特異的バインダーに対して容易にアクセス可能であるべきである(Pasqualini et al. (1997), Nature Biotechnol., 15, 542-546; Neri et al. (1997), Nature Biotechnol., 15 1271-1275)。新生欠陥構造の標的化された閉塞は、腫瘍の梗塞および崩壊を生ずる結果になる(O'Reilly et al. (1996), Nature Med., 2, 689-692; Huang et al. (1997), Science, 275, 547-550)。

#### 【 0 0 0 4 】

フィブロネクチン分子中に交互に継ぎ合わせることによって挿入されるフィブロネクチンのED-Bドメインは、マウス、ラットおよびヒトにおいて等しく91個のアミノ酸の配列であって、新生血管構造の回りに特異的に累積し(Castellani et al. (1994), Int. J. Cancer 59, 612-618)、そして分子のインターベンションに対する標的を表すことができる。事実、我々は最近、抗ED-B単鎖Fv抗体フラグメント(scFv)が、腫瘍のあるマウスの腫瘍血管中に選択的に累積すること、並びに抗体親和性が現れて標的化性能を指示することを蛍光法によって示した(Neri et al. (1997), Nature Biotechnol., 15 1271-1275) (GB 96 / 1 0 9 6 7 . 3に基づく国際特許出願第PCT / GB 97 / 0 1 4 1 2号)。腫瘍標的化は、注入後24時間、またはそれより遅い時点において評価された。

#### 【 0 0 0 5 】

従来から、ED-Bドメインに抗する抗体を腫瘍標的化用を使用するために、それらを出現させるための種々の試みが知られている。

#### 【 0 0 0 6 】

ピーター等は(Peters et al. Cell Adhesion and Communication 1995, 3: 67-89)、生来のED-Bドメイン以外のFN配列を含まない抗原に対して出現したポリクロナール抗体を開示し、そして、それらの抗体が特異的且つ直接的にこのドメインに結合することを示している。

#### 【 0 0 0 7 】

しかしながら、ピーター等の試薬は、一連の欠点を有する。即ち、ピーター等の抗血清は、ED-B(+)-FNをN-グリカナーゼによる処置後にだけ認識する。このことは、脱グリコシル化をインピボで行うことができないという理由から、これらの試薬を腫瘍の標的化、撮像および治療のような応用にとって不適切なものにする。

#### 【 0 0 0 8 】

著者等は彼ら自身、それらの抗体が哺乳類細胞によって生成された完全な長さのED-B(+)-FNを認識しないことを確認している。彼らはまた、フィブロネクチンの他のドメイン(例えば、ED-A)に抗する抗体が生成されているにも関わらず、ED-Bドメインに対して特異的なモノクロナール抗体を生成することが不可能であったことを確認している。ポリクロナール抗血清が上述した応用に受け入れられないものであることは、従来から周知のことである。

#### 【 0 0 0 9 】

この分野における何年もの意欲的な研究の後でさえも、N-グリカナーゼによる処置なしにフィブロネクチンのED-Bドメインを認識するモノクロナール抗体は、本発明で適用されるファージ表示法を使用した場合にのみ生成できる。

#### 【 0 0 1 0 】

ザング等(Zang et al., Matrix Biology 1994, 14: 623-633)は、犬歯のED-Bドメインに抗して出現したポリクロナール抗血清を開示している。著者等は、ヒトのED-B(+)-FNに対する交差反応性を期待しているが、このことはテストされてはいない。しかしながら、著者等は、フィブロネクチンのED-Bドメインを直接認識するモノクロナール抗体を生成することの困難性を確認している(631頁)。その抗血清は、ED-B(+)-FNを、N-グリカナーゼによる処置後にのみウエスタンブロット法で認識する。前述したように、グリカナーゼ処置は、これらの試薬が本発明による応用には不適切

10

20

30

40

50

であることを示している。

【0011】

ELISAにおけるED-B(+)-FNの認識は、変性剤(4Mの尿素)によって抽出され、そしてゼラチンを使用してプラスチック上に捕捉された軟骨についてだけ、脱グリコシル化の必要性無しに進行する。著者等は、「ELISAプレートのプラスチック表面に結合したゼラチンへのFN分子の結合は、抗血清による認識に対して十分なエピトープをどうにか露出することができる」と注釈している。インビボ応用にとって、FNは変性およびゼラチン結合されないので、本発明のモノクロナールバインダーは、異なる利点を提供する。

【0012】

日本国特許JP02076598およびJP04169195は、抗ED-B抗体について言及している。これらの文献からは、モノクロナール抗ED-B抗体が記載されているかは不明である。更に、単一の抗体(例えば、JP02076598に記載された抗体)が、「化学式(1)、(2)または(3)のアミノ酸配列の抗原決定基」を有することは、以下の証拠に基づいて、不可能であるように見える。

【0013】

- (1) EGIPIFEDFVDSSVGY
- (2) YTVTGLEPGIDYDIS
- (3) NGGESAPTTLTQQT

【0014】

i) モノクロナール抗体は、良く規定されたエピトープを認識すべきである。  
ii) フィブロネクチンのED-Bドメインの3次元構造は、NMR分光分析によって決定されている。セグメント(1)、(2)および(3)は、ED-B構造の逆の面にあり、そして1つのモノクロナール抗体によって同時に結合されることができない。

【0015】

更に、抗体の有用性を実証するためには、腫瘍中の局在化が、構造崩壊性試薬による処置をしない生物学的試料中のED-B(+)-FN構造の染色の証拠と同様に、実証されるべきである。

【0016】

カーネモラ等(Carnemolla et al. 1992, J. Biol. Chem. 267, 24689-24692)によって説明されたBC1抗体は、FNのドメイン7上のエピトープを認識するが、フィブロネクチンのED-Bドメインの存在下で潜在的であるED-Bドメイン上のエピトープを認識することがない。それは厳密にヒト特異的である。それ故、BC1抗体と本発明の抗体とは、異なる反応性を示す。更には、BC1抗体は、ドメイン7を単体で、またED-Bドメインの不存在下ではフィブロネクチンのドメイン7~8を認識する(Carnemolla et al. 1992, J. Biol. Chem. 267, 24689-24692)。このようなエピトープは、FN分子のタンパク分解性の劣化によってインビボで生成することができる。本発明による試薬の利点は、それらがED-Bドメインを含有している場合にだけ、それらがFN分子またはフラグメント上に局在化できる点である。

【0017】

癌の診断のために、そしてより特異的には一次および二次腫瘍疾患に対して、免疫シンチグラフィは、1つの選択される技術である。この方法論では、患者は、放射線標識化された化合物(例えば、好適なビヒクルにリンクされた放射線核種)を注入された後に、好適な装置(例えば、ガンマ線カメラ)によって撮像される。シンチグラフ応用については、イオン化放射に対する患者の被爆を最小化するために、典型的には短寿命のガンマ線エミッタ、例えばテクネチウム-99m、ヨウ素-123またはインジウム-111が使用される。

【0018】

核医薬部門で最も頻繁に使用される放射線核種は、テクネチウム-99m(99mTc)、即ち半減期が6時間のガンマ線エミッタである。99mTcベースの放射線医薬を注

10

20

30

40

50

射された患者は、典型的には注入後 12 ~ 24 時間まで撮像され得るが、関心のある病状への核種の累積は早い時点であることが望ましい。

【0019】

更には、新規に形成された血管上へ迅速且つ選択的に局在化可能な抗体が利用できる場合、研究者は、診断および/または治療の利益を達成するために、抗体と接合するための他の好適な分子を探求することを刺激されるであろう。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

注入後数時間で腫瘍病状を局在化可能な放射線医薬用の核医薬の必要性和、抗体親和性が現われてその性能を血管新生の標的化に影響させる情報とを鑑みて、本発明の1つの目的は、フィブロネクチンのED-Bドメインに特異的な、サブナノモルの解離定数を有する抗体を生成することにある(抗体 抗原親和性の定義および測定についてのレビューに関しては、例えばNeri et al. (1996), Trends in Biotechnol. 14, 465-470を参照のこと)。本発明の異なる目的は、フィブロネクチンのED-Bドメインに抗するものであって、注入後数時間で既に腫瘍病状を検出する放射線標識化された好適な形態の抗体を提供することにある。

10

【課題を解決するための手段】

【0021】

本発明の1つの形態では、これらの目的は、フィブロネクチンのED-Bドメインの特性エピトープに対する特異的親和性と、前記ED-Bエピトープに対する改善された親和性とを有する抗体によって達成される。

20

【0022】

本発明の異なる形態では、上述した抗体は、血管新生のマーカーの迅速な標的化に使用される。

【0023】

本発明の他の形態は、前記抗体と、血管新生を検出するための1以上の試薬とを備える診断キットである。

【0024】

本発明の更に異なる形態は、血管増殖によって特徴付けられる腫瘍および疾病の診断および治療をするための前記抗体の用途である。

30

【0025】

最後に、本発明の重要な形態は、上記抗体並びに好適な光活性分子(例えば、妥当に選択された光増感剤)を備える抱合体と、新血管の選択的に光伸介された閉塞用のそれらの用途によって代表される。

【0026】

[用語]

この出願を通して、いくつかの技術的表現が使用され、それらに対して以下の定義が適用される。

【0027】

- 抗体

これは、天然の、あるいは部分的にまたは全体が合成的に生成された免疫グロブリンを記述する。この用語はまた、抗体結合ドメインであるか、またはそれと同族である結合ドメインを有する如何なるポリペプチドまたはタンパク質もカバーする。これらは、天然のソースに由来するか、またはそれらは、部分的にまたは全体が合成的に生成され得る。抗体の例としては、免疫グロブリンのイソタイプおよびそれらのイソタイプのサブクラスと、Fab、scFv、Fv、dAb、Fdのような抗原結合ドメインから構成されるフラグメントと、ダイアボディ(diabody)とがある。モノクローナルおよび他の抗体をとり、そして組換えDNA法の技術を使用して、元の抗体の特異性を保持する他の抗体やキメラ分子を生成することが可能である。このような技術は、1つの抗体の免疫グロブリン可変

40

50

部または相補性決定部位(CDR)を、異なる免疫グロブリンの定常部または定常部+枠組み構造領域にするDNA符号化の導入を含む。例えば、EP-A-184187、GB2188638AまたはEP-A-239400を参照のこと。抗体を生成するハイブリドーマまたは他の細胞は、生成された抗体の結合特異性を変更するか、または変更しない、遺伝子学的突然変異または他の変化に投入される。1つの抗体は多数の方法で修飾されるので、「抗体」という用語は、必要とされる特性を有する結合ドメインを備えた如何なる特異的結合メンバーまたは基質をもカバーするように構築されるべきである。かくして、この用語は、抗体のフラグメント、誘導体、機能的等価物および抗体の相同染色体をカバーし、天然あるいは全体または部分的に合成された免疫グロブリン結合ドメインを有する如何なるポリペプチドをも含むことになる。免疫グロブリン結合ドメイン又は等価物を有して、他のポリペプチドに融合したキメラ分子は、それ故含まれることになる。キメラ抗体のクローン化と発現は、EP-A-0120694およびEP-A-0125023に記載されている。抗体全体のフラグメントが結合抗体の機能を果たし得ることが示されている。結合フラグメントの例には、(i)VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなるFabフラグメント；(ii)VHおよびCH1ドメインからなるFdフラグメント；(iii)単一抗体のVLおよびVHドメインからなるFvフラグメント；(iv)VHドメインからなるdAbフラグメント(Ward et al. (1989) Nature, 9, 341, 544-546)；(v)隔離されたCDR部位；(vi)リンクされた2つのFabフラグメントを備える2つのフラグメントであるF(ab')<sub>2</sub>フラグメント；(vii)2つのドメインを会合させて1つの抗原結合部位を形成させるポリペプチドリンカーによって、1つのVHドメインと1つのVLドメインとがリンクされた単鎖Fv分子(scFv)(Bird et al. (1988) Science, 242, 423-426., 426.; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5879-83.)；(viii)パイスペシフィック(bispecific)単鎖FVダイマー(PECT/US92/09965)；そして(ix)遺伝子融合によって構築された多価または多特異的フラグメントである「ダイアボディ(diabody)」が含まれる(WO94/13804; Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90, 6444-6448)。ダイアボディは、ポリペプチドの多重結合体(multimer)であり、各ポリペプチドは、免疫グロブリンL鎖の結合領域を有する第1のドメインと、免疫グロブリンH鎖の結合領域を有する第2のドメインとを備える。2つのドメインは(例えば、ペプチドリンカーによって)リンクされているが、互いに会合して抗原結合部位を形成することは不可能である。抗原結合部位は、多重結合体内の1つのポリペプチドの第1のドメインと、その多重結合体内のもう1つのポリペプチドの第2のドメインとの会合によって形成される(WO94/13804)。パイスペシフィック抗体が使用される場合は、これらは種々の手法で製造され得る通常のパイスペシフィック抗体であり(Holliger and Winter (1993), Curr. Opin. Biotech., 4, 446-449)、例えば化学的にまたは混合ハイブリドーマから調製されるか、あるいは上述したパイスペシフィック抗体フラグメントのいずれかである。抗体全体よりも、むしろscFvダイマーまたはダイアボディを使用することの方が好ましい。ダイアボディおよびscFvは、可変ドメインだけを使用し、潜在的に抗イディオタイプ反応の効果を低減して、Fc領域無しで構築することができる。パイスペシフィック抗体の他の形態には、ネリ等によって記載されている単鎖CRAbsがある(Neri et al. (1995), J. Mol. Biol., 246, 367-373)。

#### 【0028】

##### - 相補性決定部位

伝統的に、抗体可変ドメインの相補性決定部位(CDR)は、特異的抗原認識に本質的な残基を含む、超可変抗体配列として同定されている。この文献では、コシアおよびレスクによるCDRの定義と番号付けを参照する(Chothia and Lesk (1987), J. Mol. Biol., 196, 901-917)。

#### 【0029】

##### - 機能的に等価な変異体形態

これは、もう1つの分子(親)とは異なる構造を有するが、いくつかの有意な相同性と

10

20

30

40

50

、親分子の生物学的機能の少なくともいくつか、例えば特別な抗原又はエピトープに結合する能力とを保持する1つの分子(変異体)のことである。変異体は、フラグメント、誘導体または突然変異体の形態である。変異体、誘導体または突然変異体は、1以上のアミノ酸の付加、削除、置換または挿入によるかまたはもう1つの分子のリンクによる、親分子の修飾によって得ることができる。これらの変化は、ヌクレオチドまたはタンパク質のレベルでなされる。例えば、符号化されたポリペプチドは、F a bフラグメントであり、それはもう1つのソースからのF cテールにリンクされる。この代わりに、酵素、蛍光等のマーカーがリンクされ得る。例えば、フィブロネクチンのE D - Bドメインの特性エピトープに抗する抗体「A」の機能的に等価な変異体形態は、相補性決定部位の異なる配列を有するが、抗体「A」の同じエピトープを認識する抗体「B」であり得る。

10

## 【0030】

我々は、フィブロネクチンのE D - Bドメインに対して特異的であって、組織部分のE D - B (+)フィブロネクチンを認識する抗体ファージ表示ライブラリから、s c F v型の組換え抗体を隔離した。これらの抗体の1つE 1は、改善された親和性を有する抗体H 1 0およびL 1 9を生成するために親和性成熟された。抗体L 1 9は、フィブロネクチンのE D - Bドメインに対して、サブナノモル濃度範囲の解離定数を有する。

## 【0031】

高親和性抗体L 1 9とD 1 . 3 (無関係な抗原であるヘンの卵のリゾチームに対して特異的な抗体)が放射線標識化され、腫瘍のあるマウスに注入された。腫瘍、血液および器官の生体分布が異なる時点で得られ、そして組織1グラム当たりの注入ドーズのパーセント(% I D / g)として表現された。

20

## 【0032】

注入3時間後既に、L 1 9に対する% I D / g (腫瘍)は、% I D / g (血液)よりも良好であったが、陰性対照D 1 . 3に対するものよりは良くなかった。腫瘍：血液比は、より長い時点で増加した。このことは、高親和性抗体L 1 9が、例えば血管新生の免疫シンチグラフィ検出に対する有用な腫瘍標的化剤であることを示唆している。

## 【0033】

- 光増感剤(フォトセンシタイザー)

光増感剤は、水および/または酸素の存在下での照射時に、毒性分子種(例えば、一重項酸素)を生成する分子として定義することができる。この毒性分子種は、生体分子と反応可能であり、それ故に細胞、組織および体液のような生物学的標的に損傷を与える可能性のあるものである。

30

## 【0034】

光増感剤は、それらが600nm以上の波長で吸収するときに、特に有用である。事実、組織および体液中への光浸透は、600~900nm範囲で最大になる[Wan et al. (1981), Photochem. Photobiol. 34, 679-681]。

## 【0035】

後に照射される光増感剤の標的化された配給は、血管新生関連の疾病に対し[Yarmush, M.L. et al. Antibody targeted photolysis. Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 10, 197-252 (1993); Rowe, P.M. Lancet 351, 1496 (1998); Levy, J. Trends Biotechnol. 13, 14-18 (1995)]、特に眼球新生血管構造の選択的な切除に対して魅力的な道である。レーザ光凝固法のように利用可能な治療様式は、直接的であれ、光増感剤の投与後であれ、選択性の欠如によって制限され、そして典型的には健康な組織および血管に損傷を生じさせる[Macular Photocoagulation Study Group, Arch. Ophthalmol. 112, 480-488 (1994); Haimovici, R. et al., Curr. Eye Res. 16, 83-90 (1997); Schmidt-Erfurth, U. et al., Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 236, 365-374 (1998)]。

40

## 【0036】

上述した論議に基づいて、光増感剤の選択性と特異性を、例えば、それらを好適なキャリア分子と接合させることによって、改善するための手法を見出すことが極めて重要であることが判る。良質のキャリア分子の開発は、とるに足らない仕事とはならないであろう

50

。更に、全てではないが、光感光剤は、それら自身が関心のある部位にインビボで「運搬される」ことを助けるであろう。光増感剤の化学構造、溶解度、親油性、粘着性および力価のようなファクターは、光増感剤の抱合体の「標的化能力(targetability)」と効能に決定的に影響しそうである。

【発明の効果】

【0037】

我々はここで、フィブロネクチンのED-Bドメインに対して特異的な高親和性L19抗体が、全身投与時に、眼球血管新生のラビットモデル中に新規に形成された血管に対して選択的に局在化することを示す。光増感剤であるスズ(IV)クロリン<sub>e</sub>に化学的に結合し、更に赤色光を照射されたL19抗体は、眼球血管新生構造の選択的閉塞を仲介し、そして対応する内皮細胞のアポトーシスを促進した。これら結果は、親眼球血管が既存のものから免疫化学的にインビボで区別されることを実証し、そして後に照射される光増感剤の標的化された配給が、盲目眼疾病と、おそらく血管新生に関連した他の病原とを処置することに効果的であることを強く示唆している。

10

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】A)、B)は、設計された抗体ファージライブラリを示す。

【図2】A、Bは、ヒト黒色腫COLO-38細胞の溶解物の2Dゲルウエスタンプロットを示す

20

【図3】A~Cは、多形膠芽腫の免疫組織化学実験を示す。

【図4】a~cは、抗体-(ED-B)錯体の安定性の分析を示す。

【図5】放射線標識化された抗体フラグメントを注入された、腫瘍のあるマウスの生体分布を示す。

【図6】L19のアミノ酸配列を示す。

【図7】A、Bは、ペレットを移植されたラビットの眼を示す。

【図8】ラビットの角膜部分の免疫組織化学を示す。

【図9】a~cは、赤色アルカリ性フォスファターゼ基質およびヘマトキシリンを使用して、ラビットの眼球構造の部分(角膜、虹彩および結膜)の免疫組織化学を示す。

【図10】a~dは、蛍光標識化された抗体の眼球新生血管構造中での局在化を示す。

【図11】a~lは、光増感剤に結合したタンパク質を注入されたラビットの眼の、照射前後の、巨視的外観を示す。

30

【図12】a~lは、光増感剤に結合したタンパク質を注入され、さらに赤色光を照射されたラビットの眼球構造の部分の顕微鏡分析を示す。

【発明を実施するための形態】

【0039】

本発明の実施形態が、以下の図面によって示される。

【0040】

図1は、設計された抗体ファージライブラリを示す。(a)抗体フラグメントは、模式的に図示されているように、pIII融解としてファージ上に表示されている。抗体結合部位(抗原の視野)では、VkのCDRの背骨が黄色であり、VHのCDRの背骨が青色である。ランダムな突然変異に向けられる残基は、VkのCDR3の91, 93, 94および96位(黄色)と、VHのCDR3の95, 96, 97および98位(青色)である。これら側鎖のCb原子は、より濃い色で示されている。抗体親和性を改善するために突然変異させられるCDR1とCDR2の残基もまた示されている(灰色で)。プログラムRasmol(<http://www.chemistry.ucsc.edu/wipke/teaching/rasmol.html>)を使用して、scFvの構造がpdbファイル1igm(Brookhaven Protein Data Bank; <http://www2.ebi.ac.uk/pcserv/pdbdb.hem>)からモデル化された。(b)は、PCR増幅とライブラリクローン化戦略である。DP47とDPK22の生殖細胞テンプレートが修飾され(テキスト参照)、CDR3領域に突然変異を生じさせた。遺伝子(gene)は矩形として示され、またCDRはその矩形内の番号付きボックスとして示されている。VH

40

50

とV Lのセグメントは、それから組み立てられ、そしてp D N 3 3 2 ファージミド(phage mid)ベクターにクローン化された。増幅および組立に使用されたプライマー (SEQ ID NO: 11からSEQ ID NO:18まで)は、最下部に掲載されている。

【0041】

図2は、2Dゲルおよびウエスタンブロット法を示す。(a)は、ヒト黒色腫C O L O - 3 8細胞の溶解物の2D - P A G Eの銀染色であり、これに対しては組換えE D - B含有7 B 8 9が添加されている。2つの7 B 8 9スポット(円形)は、タンパク質増殖に使用されたH i s - タグ(tag)の部分的なタンパク分解による。(b)は、抗E D - BのE 1(表1)と、検出試薬としてのM 2の抗F L A G抗体とを使用した、図2 aのものと同じのゲルの免疫ブロットである。7 B 8 9スポットだけが検出され、ゲルのスポットから隔離された組換え抗体の特異性が確認された。

10

【0042】

図3 A ~ 3 Cは、多形膠芽腫のシリアルな部分についての免疫組織化学実験であり、s c F vのE 1(A)、A 2(B)およびG 4(C)を使用して染色された典型的な糸状血管構造を示している。スケールバーは、20 μmである。

【0043】

図4は、抗体・(E D - B)錯体の安定性と、フィブロネクチンのE D - Bドメインに対するs c F vのE 1、H 1 0およびL 1 9の結合の分析とを示す。(a)は、抗体の親和性 - 成熟について得られた改善された解離プロフィールを示すB I A c o r eのセンサグラム(sensogram)である。(b)は、s c F v・(E D - B)錯体の生来のゲル電気泳動分析である。高親和性抗体L 1 9だけが蛍光標識化された抗原との間で安定した錯体を形成できる。蛍光検出は、説明されているように行われた(Neri et al. (1991) Bio Techniques, 20, 708-712)。

20

【0044】

(c) s c F v・(E D - B ビオチン)錯体と、100倍過剰なモルの非ビオチニル化(unbiotinylated)E D - Bとの競合は、O r i g e n装置を使用して、エレクトロケミルミネッセンスによってモニタされた。L 1 9・(E D - B)錯体に対する長い半減期は、観察することができる。黒四角は、L 1 9であり、白三角は、H 1 0である。

【0045】

図5は、放射線標識化抗体フラグメントを注入された、腫瘍のあるマウスの生体分布を示す。

30

【0046】

腫瘍および血液の生体分布は、グラム当たりの注入ドーズ量のパーセントして表現され、時間に対してプロットされている。関連する器官の生体分布もまた報告されている。

【0047】

図6は、H鎖(V H)、リンカーおよびL鎖(V L)を有する抗体L 1 9のアミノ酸配列を示す。

【0048】

図7 Aおよび7 Bは、血管新生基質に浸漬されたポリマーペレットを移植されたラビットの眼を示す。

40

【0049】

図8は、新形成血管を有し、L 1 9抗体で染色されたラビットの角膜部分の免疫組織化学を示す。

【0050】

図9は、L 1 9抗体を使用した、ラビットの眼球構造の免疫組織化学研究を示す。特異的赤色染色は、角膜の新生血管構造の回りで観察される(a)が、紅彩(b)と結膜(c)の血管の回りでは観察されない。小さい矢印は、角膜上皮である。関連する血管は、大きな矢印で示される。スケールバーは、50 μmである。

【0051】

図10は、眼球血管新生を標的化する、蛍光標識化抗体の免疫光検出を示す。強い蛍光

50

性角膜血管新生（矢印で示される）は、FNのED-Bドメインに特異的な抗体抱合体L19-Cy5を注入されたラビット（a）で観察されるが、抗体HyHEL-10-Cy5を注入されたラビット（b）では観察されない。角膜部分についての免疫蛍光顕微鏡は、角膜の新生欠陥構造の回りに、L19-Cy5は局在化するが（c）、HyHEL-10-Cy5は局在化しない（d）ことを確認した。画像（a, b）は、抗体注入から8時間後に得られたものであり、（c, d）は、抗体注入から24時間後にラビットから隔離された角膜部分を使用して得られたものである。Pは、ペレットである。

#### 【0052】

図11は、光増感剤の抱合体で処置されたラビットの眼の巨視的画像を示す。（a）は赤色光の照射前の、また（b）は照射から16時間後の、L19-PSを注入されたラビットの眼である。矢印は、凝固した新生血管を示す。これは、照射から16時間後のパネル（c）のCy5フルオロアンジオグラム(fluoroangiogram)内のハイボ蛍光領域として確認されたものである。他の欠陥構造、例えば膨張した結膜血管中では何も凝固は観察されないという点を明記すべきである。比較のために、漏出血管のハイパー蛍光を伴うCy5フルオロアンジオグラムと、ラビットの未処置の眼の対応するカラー写真が、（d）と（h）に示されている。写真（e, f, g）は、（a, b, c）と類似しているが、これらはオバルミン-PSを注入され、さらに赤色光を照射されたラビットに対応したものである。凝固は、何も観察することができず、そしてアンジオグラムは、漏出血管のハイパー蛍光を明らかにした。早期血管新生を有し、L19-PSを注入されたラビットの眼は、（i-l）に示されている。赤色光の照射前（i）および照射から16時間後（j）の画像は、広範囲の選択的な光誘導血管内凝固（矢印）を明らかにしている。血管閉塞（矢印）は、安楽死直後のラビットの照射された眼（l）では特に明らかであるが、同じラビットの未照射の眼（k）では検出することができない。Pは、ペレットである。矢印の先端は、角膜-強膜接合部（角膜輪部）を示している。全ての図において、膨張した既存の結膜血管が角膜輪部の上に見えるが、それでも角膜新生血管の成長は、角膜輪部からペレット（P）に向かって観察できる。

#### 【0053】

図12は、選択的な血管閉塞の顕微鏡分析を示す。ラビットの角膜のH/E部分（a, e, b, fは非固定、i, jはパラホルムアルデヒド固定）は、オバルミン-PS（a, e, i）またはL19-PS（b, f, j）を注入され、さらに照射されたものである。大きな矢印は、代表的な非損傷の血管（e, i）または完全に閉塞された血管（f, j）を示す。照射後にL19-PSによって仲介された角膜新生血管構造の選択的閉塞と制限された血管周囲損傷（エオジン好性）（b, f, j）とは対照的に、結膜の血管（k）と虹彩の血管（l）は、同じラビットについて損傷のサインを示していない。蛍光TUNELアッセイは、L19-PSを注入され（c, g）、あるいはオバルミン-PSを注入され（d, h）、照射されたラビットの部分で異なる数のアポトーシス細胞を示している。大きな矢印は、いくつかの関連する血管構造を示す。小さな矢印は、角膜上皮を示す。スケールバーは、100 μm（a~d）と25 μm（e~l）である。

#### 【0054】

本発明は、以下の実施例によって更に厳密に説明される。

#### 【0055】

##### [実施例1]

フィブロネクチンのED-Bドメインに対して特異的なヒトscFv抗体フラグメントの、抗体ファージ表示ライブラリからの隔離

ヒト抗体ライブラリが、VH(DP47; Tomlinson et al. (1992), J. Mol. Biol., 227, 776-798)およびVk (DPK22; Cox et al. (1994), Eur. J. Immunol., 24, 827-836)生殖細胞遺伝子を使用してクローン化された（クローン化および増幅戦略については、図1を参照のこと）。このライブラリのVH成分は、部分的に劣化したプライマー（図1）（SEQ ID NO:11からSEQ ID NO:18まで）を使用して、CDR3の95~98位にランダムな突然変異を導入するためのPCRをベースとした方法によって生成された。このライブラ

10

20

30

40

50

りのV L成分は、C D R 3の9 1, 9 3, 9 4および9 6位にランダムな突然変異を導入することによって、同様の手法で生成された。P C R反応は、記載されているように行われた(Marks et al. (1991), J. Mol. Biol., 222, 581-597)。V H - V Lのs c F vフラグメントは、P C Rアッセムブリによって(Figure 1; Clackson et al. (1991), Nature, 352, 624-628)、ゲル精製されたV HおよびV Lセグメントから構築された。3 0 μ gの精製されたV H - V Lのs c F vフラグメントは、それぞれ3 0 0ユニットのN c o lおよびN o t 1により二重に消化され、それから1 5 μ gのN o t 1 / N c o l消化p D N 3 3 2ファージミドベクターに結紮された。p D N 3 3 2は、ファージミドp H E N 1の誘導体であり(Hoogenboom et al. (1991), Nucl. Acids Res., 19, 4133-4137)、N o t 1部位と、遺伝子IIIに先行するアンバーコドンとの間の配列は、D 3 S D 3 - F L A G - H i s 6 タグに対し符号化する下記の配列によって置換されている(Neri et al. (1996), Nature Biotechnology, 14, 385-390)。

## 【 0 0 5 6 】

Not1 D D D S D D D  
Y K D D  
5' - GCG GCC GCA GAT GAC GAT TCC GAC GAT GAC TAC AAG GAC GAC

D D K H H H H H H amber  
GAC GAC AAG CAC CAT CAC CAT CAC CAT TAG - 3'

## 【 0 0 5 7 】

T G 1大腸菌株への形質転換は、マークス等(Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222, 581-597)に従って行われ、またファージは、標準プロトコルに従って調製された(Nissim et al., (1991), J. Mol. Biol., 222, 581-597)。拡大する汚染の不存在を調べるために、5つのクローンがランダムに選択され、そして配列化された。

## 【 0 0 5 8 】

組換えフィブロネクチンのフラグメントであって、タイプIIIの相同性の繰り返しをそれぞれ1および4含んだE D - Bおよび7 B 8 9は、p Q E 1 2ベースの発現ベクター(Qiagen, Chatsworth, CA, USA)から、記載されているように発現された(Carnemolla et al. (1996), Int. J. Cancer, 68, 397-405)。

## 【 0 0 5 9 】

フィブロネクチンの組換えE D - Bドメインに対する選択(Carnemolla et al. (1996), Int. J. Cancer, 68, 397-405; Zardi et al. (1987), EMBO J., 6, 2337-2342)は、ビオチンジスルフィドN - ヒドロキシスクシンイミドエステルでビオチニル化(biotinylated)され、さらに2 Dゲルから溶離された抗原(reagent B-4531; Sigma, Buchs, Switzerland; 10)と、ストレプトアビジンで被覆されたダイナビーズキャプチャー(Dynabeads capture, Dynal, Oslo, Norway)とを使用して1 0 n M濃度で行われた。1 0 1 3のファージが、毎回のパニング(panning)について、1 m lの反応に使用された。ファージは、2%ミルク / P B S (M P B S)中の抗原で1 0分間培養された。この溶液に対して、M P B S中でプリブロックされた1 0 0 μ lのダイナビーズ(Dynabeads, 10 mg/ml; Dynal, Oslo, Norway)が添加された。5分間混合した後に、ビーズは溶液から磁気的に分離され、そしてP B S - 0 . 1% T w e e n 2 0 (P B S T)で7回、さらにP B Sで3回洗浄された。溶離は、5 0 m Mのジチオトレイトール(D T T)5 0 0 μ lによる2分間の培養によって行われ、抗原とビオチンとの間のジスルフィド架橋を低減した。ビーズは再度捕捉され、そして結果として生じた溶液は、指数的に成長するT G 1大腸菌細胞に影響を与えるために使用された。3回のパニングの後に、溶離されたファージは、指数的に成長するH B 2 1 5 1大腸菌細胞に影響を与えるために使用され、そして(2 x T Y + 1%グルコース + アンピリシリン1 0 0 μ g / m l) - 1 . 5%寒天プレート上に配置された。単一コロニーは、2 x T Y + 0 . 1%グルコース + アンピリシリン1 0 0 μ g / m l中で成長させられ、そして抗体発現を達成するために3 0度で一昼夜、1 m MのI P T Gにより誘導された。結果として得られた上澄みは、1 0 n Mのビオチニル化E D - Bによって処置

10

20

30

40

50

されたストレプトアビジン被覆微細滴定プレートと、抗FLAGのM2抗体(ABI Kodak, New Haven, CT)を検出試薬として使用して、ELISAによってスクリーニングされた。スクリーニングされたクローンの32%は、このアッセイでは陽性であった。その中で最強のELISA信号を与えた3つ(E1、A2およびG4)が配列化され、更に特徴付けされた。

#### 【0060】

ELISAアッセイは、ゲルスロットから回復されたビオチニル化ED-Bと、変性されていないビオチニル化ED-Bと、隣接するフィブロネクチンのドメインにリンクしたED-B(7B89ドメインを含む組換えタンパク質)と、多数の無関係な抗原とを使用して行われた。抗体E1、A2およびG4は、3つのED-B含有タンパク質全てと強く、且つ特異的に反応した。このことは、ED-B親和性カラムを使用して、3つの組換え抗体をバクテリアの上澄みから精製可能であるという事実と共に、ED-Bの生来の配座中に存在しているエピトープを、それらが認識していることを強く示唆している。ED-Bドメインを含有しないフィブロネクチンのフラグメントとの間では、何も反応は検出されなかった(データは示されていない)。

10

#### 【0061】

ゲルスロットに対して隔離された抗体が、生来の抗原に向けて良好な親和性を有していたか否かをテストするために、BIACORE設備上での表面プラスモン共鳴を使用して、記載されているように(Neri et al. (1997) Nature Biotechnol., 15, 1271-1275)、実時間相互作用分析が行われた。E1、A2およびG4のscFvフラグメントのモノマーフラクションは、10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup>のM-1範囲内の親和力でED-Bに結合した(表1)。

20

#### 【0062】

抗体の特異性および有用性の異なるテストとして、2D-PAGE免疫プロットが行われた。即ち、ヒト黒色腫COLO-38細胞の溶解物をゲル上で運用し、それに対して微量のED-B含有組換え7B89タンパク質が添加された(図2)。scFv(E1)は、7B89スポットだけを強く、且つ特異的に染色した。

#### 【0063】

抗体E1、A2およびG4は、顕著な血管新生過程を伴う積極的なヒト脳腫瘍である多形膠芽腫のクリオスタット部分に、ED-B含有フィブロネクチン(B-FN)を免疫局在化するために使用された。図3は、3つの抗体によって赤色に染色された典型的な糸状血管構造を有する多形膠芽腫のシリアルな部分を示している。外科的手法で除去された直後に液体窒素で凍結された多形膠芽腫試料の部分に対する免疫染色が、記載されているように行われた(Carnemolla et al. (1996), Int. J. Cancer, 68, 397-405; Castellani et al. (1994), Int. J. Cancer, 59, 612-618)。要するに、M2-抗FLAG抗体(ABI Kodak)と、ビオチニル化抗マウスポリクロナール抗体(Sigma)と、ストレプトアビジン-ビオチンのアルカリ性フォスファターゼ錯体染色キット(BioSpa, Milan, Italy)と、ナフトール-AS-MX-リン酸塩およびファーストレッドTR(Sigma)とを使用して免疫染色が行われた。ギル(Gill)のヘマトキシリンは、対向染色(counter-stain)として使用され、それから既に報告したように(Castellani et al. (1994), Int. J. Cancer, 59, 612-618)、グリセルゲル(glycergel, Dako, Carpenteria, CA)中に搭載された。

30

40

#### 【0064】

同様の技術と抗体L19とを使用して(次の実施例を参照)、我々はまた、新形成血管を特異的に染色することができた。この新形成血管は、血管内皮成長因子又はホルボールエステルのような血管新生基質が浸漬されたポリマーペレットをラビットの角膜中に移植することによって誘導されたものである。

#### 【0065】

##### [実施例2]

サブナノモルの親和性でED-Bに結合するヒトscFv抗体フラグメントの隔離  
scFv(E1)が選択され、その親和性の改善可能性が、抗原結合部位の周辺部に位

50

置するCDR残基の制限された数の突然変異に対してテストされた(図1A)。我々は、抗体VHの残基31~33、50、52および54を結合的に突然変異させ、そして対応するレパートリーを繊維状ファージについて表示した。これらの残基は、抗体・抗原錯体の既知の3次元構造中の抗原と頻繁に接触することが見出されている。結果として得られた $4 \times 10^8$ 個のクローンのレパートリーは、フィブロネクチンのED-Bドメインに結合するために選択された。2回のパニングと96個の個別クローンのスクリーニングの後、親和性が27倍改善された抗体が隔離された(H10;表1および2)。他の人達が親和性成熟抗体について観察していることと同様に、改善された親和性は、改善された $k_{on}$ 値によってというよりはむしろ、抗原からのより緩やかな解離に起因していた(Schier et al. (1996), *Gene*, 169, 147-155; Ito (1995), *J. Mol. Biol.*, 248, 729-732)。

L鎖を欠いた天然および人工的双方の抗体が依然として抗原に結合できるという事実によって支持されるように、抗体のL鎖は、抗原結合親和性にあまり貢献していない、としばしば考えられている(Ward et al. (1989) *Nature*, 341, 544-546; Hamers-Casterman et al. (1993), *Nature*, 363, 446-448)。この理由のために、我々は、抗原結合部位の中心に位置し(図1a)、しばしば抗原に接触することが3D構造中に見出されるVLドメインの2つの残基(32および50)だけを無作為化することを選択した。結果として得られる400のクローンを含んだライブラリーは、ファージ上に表示され、そして抗原結合用に選択された。BIAcore設備による実時間相互作用分析を用いる解離プロフィールの解析(Jonsson et al. (1991), *BioTechniques*, 11, 620-627)と、エレクトロケミルミネッセンス検出を用いる競合実験による $k_{off}$ 測定とから、 $K_d = 54 \text{ pM}$ のフィブロネクチンのED-Bドメインに結合する1つのクローン(L19)が同定された(表1および2)。

#### 【0066】

親和性成熟実験は、次のように行われた。scFv(E1)の遺伝子は、VHのCDR1の31~33位にランダムな突然変異を導入するために(番号付けについては:28)、プライマーLMB1bis(5'-GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG-3') (SEQ ID NO:1)とプライマーDP47CDR1for(5'-GA GCC TGG CGG ACC CAG CTC ATM NNM NNM NNG CTA AAG GTG AAT CCA GAG GCT G-3') (SEQ ID NO:2)で増幅され、またVHのCDR2の50, 52, 54位をランダムに突然変異させるために、プライマーDP47CDR1back(5'-ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CC-3') (SEQ ID NO:3)とプライマーDP47CDR2for(5'-GTC TGC GTA GTA TGT GGT ACC MNN ACT ACC MNN AAT MNN TGA GAC CCA CTC CAG CCC CTT-3') (SEQ ID NO:4)で増幅された。VH遺伝子の3'位、ペプチドリンカーおよびVL遺伝子をカバーするscFv遺伝子の残りのフラグメントは、プライマーDP47CDR2back(5'-ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG-3') (SEQ ID NO:5)とプライマーJforNot(5'-TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC TTT GAT TTC CAC CTT GGT CCC TTG GCC GAA CG-3') (SEQ ID NO:6)で増幅された(94Cで1分、60Cで1分、72Cで1分)。結果として得られた3つのPCR生成物は、ゲル精製され、プライマーLMB1bisおよびJforNotを有するPCR(21)によって組み立てられた(94Cで1分、60Cで1分、72Cで1分)。結果として得られた単一のPCR生成物は、PCR混合物から精製され、NotI/NotIで二重に消化され、NotI/NotI消化pDN332ベクターに結紮された。約9 $\mu\text{g}$ のベクターと3 $\mu\text{g}$ のインサートが結紮混合物中で使用された。この混合物は、フェノール化およびエタノール沈殿によって精製され、50 $\mu\text{l}$ の無菌水中に再懸濁され、さらに電気適格性TGI大腸菌細胞内で電気穿孔された。結果として得られた親和性成熟ライブラリーは、 $4 \times 10^8$ 個のクローンを含んでいた。記載されているように生成された抗体-ファージ粒子(Nissim et al. (1994), *EMBO J.*, 13, 692-698)は、7B89被覆免疫チューブ(Carnemolla et al. (1996), *Int. J. Cancer*, 68, 397-405)上での1回目の選択に使用された。選択されたファージは、ピオチニル化ED-Bによって行われる2回目のパニングに使用され、それからストレプトアビジン被覆磁気ビーズ(Dynal, Oslo, Norway; see previous paragraph)によって捕捉された。選択後の、約25%のクローンが可溶性ELISAで陽性であった(実験プ

10

20

30

40

50

ロトコルについては前章を参照のこと)。E L I S Aで陽性の候補から、我々は更に、最低のk o f fを有する1つ(H 1 0 ;表 1)をB I A c o r e分析(Jonsson et al. (1991), BioTechniques, 11, 620-627)によって同定した。

#### 【 0 0 6 7 】

s c F v (H 1 0)の遺伝子は、V LのC D R 1の3 2位にランダムな突然変異を導入するために(番号付けについては: Chothia and Lesk (1987) J.Mol.Biol., 196, 901-917)、プライマーL M B 1 b i sおよびD P K C D R 1 f o r (5'-G TTT CTG CTG GTA CCA GGC TAA MNN GCT GCT GCT AAC ACT CTG ACT G) (SEQ ID NO:7)でP C R増幅され、またV LのC D R 2の5 0位にランダムな突然変異を導入するために、プライマーD P K C D R 1 b a c k (5'-TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA CC-5') (SEQ ID NO:8)およびプライマーD P K C D R 2 f o r (5'-GCC AGT GGC CCT GCT GGA TGC MNN ATA GAT GAG GAG CCT GGG AGC C-3') (SEQ ID NO:9)によって増幅された。s c F v遺伝子の残りの部分は、オリゴ類D P K C D R 2 b a c k (5'-GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC-3') (SEQ ID NO:10)およびJ f o r N o tで増幅された(9 4 Cで1分、6 0 Cで1分、7 2 Cで1分)。結果として得られた3つのP C R生成物は、H鎖の突然変異誘発に対して説明したようにして、組み立てられ、消化され、そしてp D N 3 3 2にクローン化された。結果として得られたライブラリは、3% B S A中のピオチニル化E D - Bによって30分間培養され、それからストレプトアビジン被覆微細滴定プレート(Boehringer Mannheim GmbH, Germany)上で10分間捕捉された。ファージは、20 mMのD T T溶液(1, 4 - ジチオ - D L - トレイトール、Fluka)で溶離され、そして指数的に成長するT G 1細胞に影響を与えるために使用された。

#### 【 0 0 6 8 】

96コロニーの上澄みにおけるE D - B結合のE L I S Aによる分析とB I A c o r eによる分析は、クローンL 1 9の同定を可能にした。抗E D - BのE 1、G 4、A 2、H 1 0およびL 1 9のs c F v抗体フラグメントは、積極的な腫瘍の部分の新形成血管を選択的に染色する(図3)。

#### 【 0 0 6 9 】

それからペニー等(Pini et al. (1997), J. Immunol. Meth., 206, 171-182)に既に記載されているように、単一の新鮮なコロニーを1リッターの2 x T Y媒体中に接種して上述した抗E D - B抗体フラグメントが生成され、さらに10 mgのE D - B含有7 B 8 9組換えタンパク質(Carnemolla et al. (1996), Int. J. Cancer, 68, 397-405)と結合しているC N B r活性化セファローズカラム(Pharmacia, Uppsala, Sweden)上に親和性精製された。装填後に、カラムは50 mlの平衡化緩衝液(P B S、1 mMのE D T A、0.5 MのN a C l)で洗浄された。抗体フラグメントは、それから100 mMのトリメチルアミンによって溶離され、直ちにp H 7のH e p e sを1 M使用して中性化され、更にP B Sに対して透析された。B I A c o r eによる親和性実験は、記載されているように(Neri et al. (1997), Nature Biotechnol., 15 1271-1275)、精製された抗体に対して行われた(図4)。バンドシフト分析は、記載されているように(Neri et al. (1996), Nature Biotechnology, 14, 385-390)、N - 終末先端部に赤外フルオロフォアC y 5 (Amersham)で蛍光標識化組換えE D - Bを使用して行われた(Carnemolla et al. (1996), Int. J. Cancer, 68, 397-405; Neri et al. (1997), Nature Biotechnol., 15 1271-1275)(図4)。B I A c o r e分析は、可能性のある再結合効果と、基底不安定性と、解離相が単一指数的プロフィールに追従することを確実にするに必要な長い実験時間とに起因して、遅い解離反応に対する動力学的パラメータの正確な決定を必ずしも可能にはしない。従って我々は、競合実験(Neri et al. (1996), Trends in Biotechnol., 14, 465-470)によって動力学的解離定数k o f fの実験を行った(図4)。簡単に説明すれば、抗E D - B抗体(30 n M)は、記載されているように(Deaver, D. R. (1995), Nature, 377, 758-760)、ルテニウム錯体で予め標識化されているM 2の抗F L A G抗体(0.5 μ g / m l)およびポリクロナル抗マウスI g G (Sigma)の存在下で、ピオチニル化E D - B(10 n M)により10分間培養された。この溶液に対して、並行反応で、非ピオチニル化E D

- B ( 1  $\mu$  M ) が異なる時間で添加された。その後、O r i g e n アッセイ緩衝液(Deaver, D.R. (1995), Nature, 377, 758-760)中に希釈されたストレプトアビジン被覆ダイナビーズが添加され ( 2 0  $\mu$  l、1 m g / m l )、その結果として得られた混合物が O R I G E N アナライザー (IGEN Inc. Gaithersburg, MD, USA) で分析された。この装置は、競合反応の終期にも依然としてピオチニル化 E D - B に結合している s c F v フラグメントの量と相関のあるエレクトロケミルミネッセンス信号 ( E C L ) を検出するものである。E C L 信号対競合時間のプロットは、特性定数 k o f f を有する単一指数に適合可能なプロファイルを生ずる ( 図 4、表 2 )。

【 0 0 7 0 】

[ 実施例 3 ]

フィブロネクチンの E D - B ドメインに対して特異的な高親和性放射線標識化 s c F v による腫瘍の標的化

放射線ヨウ素化 s c F v ( L 1 9 ) または s c F v ( D 1 . 3 ) ( ヘンの卵のリゾチームに対して特異的な無関係の抗体 ) が、ミューライン F 9 奇形癌、即ち急速に成長する積極的な腫瘍を皮下移植されたマウスの静脈に注射された。抗体の生体分布は、異なる時点で得られた ( 図 4 )。s c F v ( L 1 9 ) および s c F v ( D 1 . 3 ) は、抗体カラム上で親和性精製され (Neri et al. (1997), Nature Biotechnol. 15, 1271-1273)、そして I o d o g e n 法 (Pierce, Rockford, IL, USA) を使用して、ヨウ素 - 1 2 5 で放射線標識化された。放射線標識化抗体を抗体カラム上に装填し、それから流通および遊離液フラクションを放射能計数することによって評価されたように、放射線標識化抗体フラグメントは、80%以上の免疫活性度を保持した。F 9 ミューライン奇形癌 (Neri et al. (1997), Nature Biotechnol. 15, 1271-1273) を皮下移植されたヌードマウス ( 生後 1 2 週目のスイスヌードのオス ) は、3  $\mu$  g ( 3 ~ 4  $\mu$  C i ) の s c F v を含む塩水溶液 1 0 0  $\mu$  l を注射された。腫瘍サイズは、大きな腫瘍が壊死性中心を有する傾向にあるので、50 ~ 250 m g であった。しかしながら、より大きな腫瘍 ( 3 0 0 ~ 6 0 0 m g ) に対して行われた標的化実験は、本質的に同じ結果を与えた。3 匹の動物は、各時点で使用された。マウスは、苦痛を与えない方法で殺処理され、そして器官は、計量および放射能計数された。代表的な器官の標的化の結果は、組織 1 グラム当たりの抗体注入ドーズのパーセント ( % I D / g ) として表現されている。S c F v ( L 1 9 ) は、腎臓を通して血液から速やかに排除された。通常の抗体とは異なり、それは肝臓や他の器官に累積することがない。組織 1 グラム当たりの注入ドーズの 8 % は、注入から 3 時間後に既に腫瘍上に局在化している。この値の後続する減少は、腫瘍が 2 4 ~ 4 8 時間で 2 倍のサイズになったという事実起因している。注入から 3、5 および 2 4 時間後の腫瘍 : 血液比は、L 1 9 に対してはそれぞれ 1 . 9、3 . 9 および 1 1 . 8 であったが、陰性対照抗体に対しては常に 1 . 0 以下であった。

【 0 0 7 1 】

放射線標識化 s c F v ( L 1 9 ) は、注入から数時間後には既に腫瘍上に優先的に局在化し、患者の血管新生の免疫シンチグラフィー検出に対するその有用性を示唆している。

【 0 0 7 2 】

[ 実施例 4 ]

新形成眼球血管を選択的に染色する抗 E D - B 抗体

既存の血管から新規な血管を形成する血管新生は、癌や、視界を失わせる眼球不調の大半を含む多くの疾病の基礎となる特性プロセスである。選択的な標的化と新生血管構造を閉塞させる能力は、診断および治療機会を開放することになる。

【 0 0 7 3 】

我々は、B - F N が、眼球血管新生の特異的マーカーであるか否か、そして B - F N を認識する抗体が、全身投与時に選択的に眼球新生血管構造をインビボで標的化することができるか否かについて調査した。この目的のために、我々は、新血管の直接観察を可能にするラビットの角膜内の血管新生を、血管内皮成長因子またはホルボールエステルを含有する外科的移植ベレットによって刺激した ( 図 7 )。スクラルフェイト (Sucralfate, kin

10

20

30

40

50

d gift of Merck, Darmstadt, Germany) / ヒドロロン(hydron)のペレットが、記載されているように[D'Amato, R.J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4082-4085 (1994)]、ニュージーランドホワイトのメスラビットの角膜に移植された。前記ペレットは、800 ngの血管内皮成長因子(Sigma)または400 ngのホルボール12-ミリスチリン酸塩13-アセテート(PMA)(phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma)のいずれかを含有している。血管新生は、両因子によって誘導された。ラビットは毎日モニタされた。両誘導物質によって新規に形成された血管は、免疫組織化学において強ED-B陽性であった。全ての更なる実験に対して、PMAペレットが使用された。

#### 【0074】

免疫組織化学的研究は、L19が、ラビットの角膜中に誘導された新生血管構造を強く染色するものの(図8, 9a)、眼の既存の血管(図9b, c)や、他の組織の既存の血管(データは示されていない)は染色しないことを示した。免疫組織化学は、記載されているように行われた[Carnemolla, B. et al., Int. J. Cancer 68, 397-405 (1996)]。

#### 【0075】

##### [実施例5]

サブナノモルの親和性でED-Bに結合し、眼球血管新生をインビボで標的化するヒト抗体フラグメントL19

前の実施例で説明した血管新生のラビット角膜モデルと、免疫光検出方法論[Neri, D. et al., Nature Biotechnol. 15, 1271-1275 (1997)]とを使用して、我々は、無関係な抗体に対する抗体フラグメント(HyHEL-10)-Cy5ではなく(図10a, b)、赤色フルオロホアCy5に化学的に結合したL19が、静脈注射時に眼球血管新生を選択的に標的化することを実証した。成長する眼球血管の蛍光染色は、注入直後にL19で明瞭に検出可能であり、そして少なくとも2日間は、腫瘍血管新生について先に観察されたものとの類似性を維持した。続く角膜部分についてのイクスビボでの免疫蛍光顕微鏡分析は、血管構造の回りで、HyHEL-10ではなく、L19の局在化を確認した(図10c, d)。

#### 【0076】

眼球新生血管形成の抗体ベースの選択的標的化の決定は、異なる種の抗B-FN抗体の反応性と共に、将来の診療的調査を保証する。免疫蛍光撮像は、病状がフルオロアンジオグラフィーで顕著になる前に、危険性のある患者の眼球血管新生の早期検出に有用である。

#### 【0077】

いくつかの方法論的詳細:

イクスビボ免疫蛍光のために、そしていくつかのH/E染色のために、角膜が、包埋に先行して、パラホルムアルデヒドを4%含むPBS中に固定された。蛍光検出実験は、5mg/kgのアセプロマジン(Acepromazin)を使用して沈静化されたラビットについて行われた。標的化実験のために、3.5mgのscFv(L19)<sub>1</sub>-Cy5<sub>0.66</sub>および2.8mgのscFv(HyHEL-10)<sub>1</sub>-Cy5<sub>0.83</sub>が、各ラビットに静脈注射された(注入時間=15分)。角膜新生血管構造中の強い蛍光は、L19の注入直後に既に観察され、数時間保持されたが、HyHEL-10の注入に対しては観察されなかった。特異性の追加的なテストとして、前日にscFv(HyHEL-10)-Cy5が注射されたが、蛍光検出では陰性であったラビットに対して、翌日にscFv(L19)-Cy5が注射された。このラビットは、角膜血管新生の強い蛍光染色を示した。

#### 【0078】

蛍光検出のために、眼は、タングステンハロゲンランプ(model Schott KL1500; Zeiss, Jena, Germany)によって照射された。このランプは、Cy5-励起フィルタ(Chroma, Brattleboro, VT, U.S.A.)と、2つの光ガイドとを装備し、その光ガイドのエミッタは、眼から約2cm離れて配置された。蛍光は、冷却C-5985モノクロームCCDカメラ(Hamamatsu, Hamamatsu-City, Japan)によって検出された。このカメラは、C-マウントキヤノンズームレンズ(V6x16; 16~100mm; 1:1.9)と、口径50mmの

10

20

30

40

50

Cy5放射フィルタ(Chroma)とを装備し、照射された眼から3~4cm離れて配置された。取得時間は、0.4sであった。

【0079】

Cy5フルオロアンジオグラフィー実験は、同じ実験的設定で行われたが、0.25mgのCy5-Trisを静脈注射した(Cy5-NHSとトリス[ヒドロキシメチル]アミノメタンの反応生成物；注入時間=5s)。取得時間は、0.2sであった。

【0080】

抗体フラグメントは、scFv型であった。scFv(L19)およびscFv(HyHEL-10)の精製と、インドシアニン染料のN-ヒドロスクシンイミド(NHS)エステルによるそれらの標識化は、どこにでも記載されている[Neri, D. et al., Nature Biotechnol. 15, 1271-1275 (1997); Fattorusso, R., et al. (1999) Structure, 7, 381-390]。2つの抗体についての抗体：Cy5標識比は、それぞれ1.5:1および1.2:1であった。Cy5-NHSは、アマーシャム社(Amersham Pharmacia Biotech, Zurich, Switzerland)から、またオバルミンは、シグマ社(Sigma, Buchs, Switzerland)から購入された。

10

【0081】

標識反応後に、抗体抱合体は、50mMのリン酸塩、pH7.4、100mMのNaCl(PBS)中で平衡化されたPD-10カラム(Amersham Pharmacia Biotech)を使用して、未統合のフルオロホアまたは光増感剤から分離された。抗体抱合体の免疫活性度は、抗体カラム上での親和性クロマトグラフィ[Neri, D. et al., Nature Biotechnol. 15, 1271-1275 (1997)]によって測定され、そして全てのケースで>78%であった。免疫抱合体は、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析され、MW=30,000ダルトンのバンドとして移動させられた(純度<sup>3</sup>90%)。

20

【0082】

[実施例6]

光増感剤スズ(IV)クロリン<sub>6</sub>に化学的に接合し、眼球血管新生を選択的に標的化し、赤色光照射時にその閉塞を仲介するヒト抗体フラグメントL19

選択的な血管切除が抗体仲介標的の力で達成されるか否かをテストするために、我々は、ラビットに対し、L19抗体フラグメントを注射し、あるいは光増感剤スズ(IV)クロリン<sub>6</sub>(以下、「PS」と呼ばれる)に結合した新形成血管(オバルミン)に局在化しない無関係なタンパク質を注射した。注射された動物の眼は、赤色光で照射された(光ドーズ=78J/cm<sup>2</sup>)。代表的な結果が図11に示されている。顕著な巨視的相違点が、照射から16時間後に、L19-PSで処置されたラビットで観察された(図11a, b)。これは、角膜新生血管構造の凝固を伴うものであるが、結膜あるいは他の眼球構造中の血管の凝固はなかった。インドシアニンフルオロホアCy5(図11c)によるフルオロアンジオグラフィーは、血管閉塞を特性ハイボ蛍光領域として確認した。これに対し、ハイパー蛍光領域は、非照射の眼の漏出新生血管構造中で観察された(図11d, h)。オバルミン-PSで処置されたラビットの照射された血管中では、検眼鏡的にも、またCy5フルオロアンジオグラフィーによっても、巨視的変更は何も検出できなかった(図11e~g)。角膜血管新生の早期における標的化L19-PS抱合体の照射の効果は、図11i~lに示されている。選択的に凝固した血管は、生存中の動物(図11i, j)で、また一層明らかには、安楽死直後の動物(図11k, l)で巨視的に視認可能である。

30

40

【0083】

光力学的な損傷は、顕微鏡技術を使用して更に調査された。照射後の血管閉塞は、L19-PSで処置された動物の非固定およびパラホルムアルデヒド固定された角膜部分の双方において、標準ヘマトキシリン/エオジン(H/E)染色法を使用して検出することができるが(図11b, f, j)、オバルミン-PSで処置されたものでは検出できない(図11a, e, i)。光増感剤抱合体によって標的化された角膜の部分のアポトーシスは、蛍光TUNELアッセイで明瞭に視認できるが(図11c, g)、陰性対照では殆ど

50

検出できない(図11d, h)。より高倍率の視野は、血管構造中の内皮細胞のアポトーシスを示した(図11g)。処置された動物の虹彩、強膜および結膜の血管への損傷は、TUNELアッセイ(図示せず)によっても、H/E染色(図11k, l)によっても観察することができた。

#### 【0084】

新生血管構造の選択的な光学的切除は、眼球不調の処置と、光拡散体または光ファイバ技術を使用する照射を受け入れ可能な他の血管新生関連の病状の処置にとって利益があることを約束する。この研究の結果は、眼球新生血管構造を、既存の血管および正常な組織を損傷することなく、選択的に閉塞できることを明らかに実証している。

#### 【0085】

いくつかの方法論的詳細：スズ(IV)クロリン<sub>6</sub>は、光増感剤のパネルから、それらの効能、可溶性および特異性に基づいて、ラビットの抗マウスポリクロナール抗体(Sigma)に結合した後に、選択された。これらの免疫抱合体は、ヒトCD47(#313441A; Pharmingen, San Diego CA, U.S.A.)に対して特異的なモノクロナール抗体で被覆された赤血球の標的化光分解によってスクリーニングされた。スズ(IV)クロリン<sub>6</sub>は、記載されているように調製された[Lu, X.M. et al., J. Immunol. Methods 156, 85-99 (1992)]。タンパク質への結合に対して、スズ(IV)クロリン<sub>6</sub>(2 mg/ml)は、ジメチルホルムアルデヒド中で、10倍過剰なモルのEDC(N'-3-ジメチルアミノプロピル-N-エチルカルボジイミド塩酸、シグマ社)およびNHS(N-ヒドロスクシンイミド、シグマ社)と室温で30分間混合された。結果として得られた活性化混合物は、それから8倍多い体積のタンパク質溶液(1 mg/ml)に添加され、そして室温で1時間培養された。

#### 【0086】

標識化反応後に、50 mMのリン酸塩、pH 7.4、100 mMのNaCl(PBS)中で平衡化されたPD-10カラム(Amersham Pharmacia Biotech)を使用して、未統合のフルオロホアまたは光増感剤から、抗体抱合体は分離された。抗体抱合体の免疫活性度は、前の実施例で説明したように測定された。

#### 【0087】

フォトキリング(photokilling)実験については、12 mgのscFv(L19)<sub>1</sub>-スズ(IV)クロリン<sub>6</sub>または38 mgのオパルミン<sub>1</sub>-スズ(IV)クロリン<sub>6</sub>がラビットに静脈注射され、そして実験の期間中は暗部に維持された。注入から8時間後に、ラビットは、ケタミン(35 mg/kg)/キシラジン(5 mg/kg)/アセプロマジン(1 mg/kg)により麻酔され、そして2つの眼の一方が、スコット(Schott)KL1500タングステンハロゲンランプによって13分間照射された。このランプは、Cy5フィルタ(Chroma)と、2つの光ガイドとを装備し、その光ガイドの先端部は、眼から1 cm離れて配置された。照射電力密度100 mW/cm<sup>2</sup>で照明された面積は、SL818光検出器(Newport Corp., Irvine, CA, U.S.A.)を使用して測定したところ、約1 cm<sup>2</sup>であった。照射後の動物の不快さのサインは、何も観察されなかった。予防処置として、ラビットは照射後に鎮静剤を受けた(ブプレノルフィン0.03 mg/kg)。フォトキリングをモニターするために、眼は検眼鏡で調査され、そしてKOWAの眼底カメラSL-14(GMP SA, Rennens, Lausanne, Switzerland)を使用して撮影された。5匹のラビットは、スズ(IV)クロリン<sub>6</sub>抱合体のそれぞれで処置され、そして一方の眼だけが照射され、他方の眼は内部陰性対照とされた。追加的対照として、2匹のラビットが照射のみされたが、光増感剤抱合体は受けなかった。

#### 【0088】

オーバードーズの麻酔剤によるラビットの安楽死直後に、眼が除核され、角膜が除去され、それからTissue-Tek(Sakura Finetech, Tokyo, Japan)中に包埋され、そして凍結された。イクスビボ免疫蛍光のために、そしていくつかのH/E染色のために、角膜が、包埋に先行して、パラホルムアルデヒドを4%含むPBS中に固定された。5 μmのクリオスタット部分は、更なる顕微鏡分析用に使用された。蛍光TUNELアッ

10

20

30

40

50

セイは、製造者の指示に従って行われた(Roche Diagnostic, Rotkreuz, Switzerland)。

【0089】

【表1】

選択された抗ED-B抗体クローンの配列

| クローン | VH鎖    |        |        |     | VL鎖 |        |
|------|--------|--------|--------|-----|-----|--------|
|      | 31-33* | 50-55* | 95-98* | 33* | 50* | 92-97* |
| A2   | SYA    | AISGSG | GLSI   | Y   | G   | NGWYPW |
| G4   | SYA    | AISGSG | SFSF   | Y   | G   | GGWLPY |
| E1   | SYA    | AISGSG | FPFY   | Y   | G   | TGRIPP |
| E10  | SFS    | SIRGSS | FPFY   | Y   | G   | TGRIPP |
| L19  | SFS    | SISGSS | FPFY   | Y   | Y   | TGRIPP |

10

【0090】

抗体クローンの関連アミノ酸位置(\*:番号付けはトムリンソン等(Tomlinson et al. (1995) EMBO J., 14, 4628-4638)による)は、設計された合成ライブラリから隔離された。単一アミノ酸コードは、標準IUPAC命名法に従って使用されている。

【0091】

【表2】

抗ED-BのscFvフラグメントの親和性

| クローン | $k_{on}(s^{-1}M^{-1})$ | $k_{off}(s^{-1})^B$  | $k_{off}(s^{-1})^C$  | $K_d(M)^*$            |
|------|------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| A2   | $1.5 \times 10^5$      | $2.8 \times 10^{-3}$ | -                    | $1.9 \times 10^{-8}$  |
| G4   | $4.0 \times 10^4$      | $3.5 \times 10^{-3}$ | -                    | $8.7 \times 10^{-8}$  |
| E1   | $1.6 \times 10^5$      | $6.5 \times 10^{-3}$ | -                    | $4.1 \times 10^{-8}$  |
| H10  | $6.7 \times 10^4$      | $5.6 \times 10^{-4}$ | $9.9 \times 10^{-5}$ | $1.5 \times 10^{-9}$  |
| L19  | $1.1 \times 10^5$      | $9.6 \times 10^{-5}$ | $6.0 \times 10^{-6}$ | $5.4 \times 10^{-11}$ |

20

30

【0092】

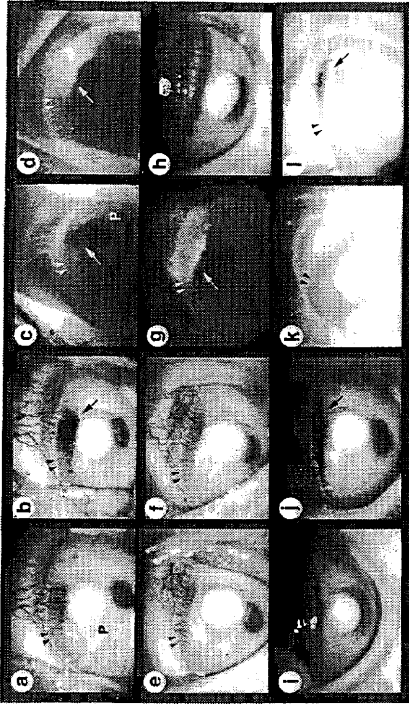
\* )  $K_d = k_{off} / k_{on}$ である。高親和性バインダーH10およびL19についてのBIAcore実験からの $k_{off}$ 値は、負に荷電されたカルボキシル化固体デキストランマトリクスの効果に起因して、十分に信頼できるものではない。従って、 $k_d$ 値は、競合実験によって得られた $k_{off}$ 測定値から計算された(Experimental Procedures)。

【0093】

$k_{off}$ は、動力的解離定数であり、 $k_{on}$ は、動力的会合定数であり、 $k_d$ 、解離定数である。B = BIAcoreで測定され、C = はエレクトロケミルミネッセンス検出との競合によって測定された。値は、密度決定の精度に基づいて、+/- 50%の正確さである。

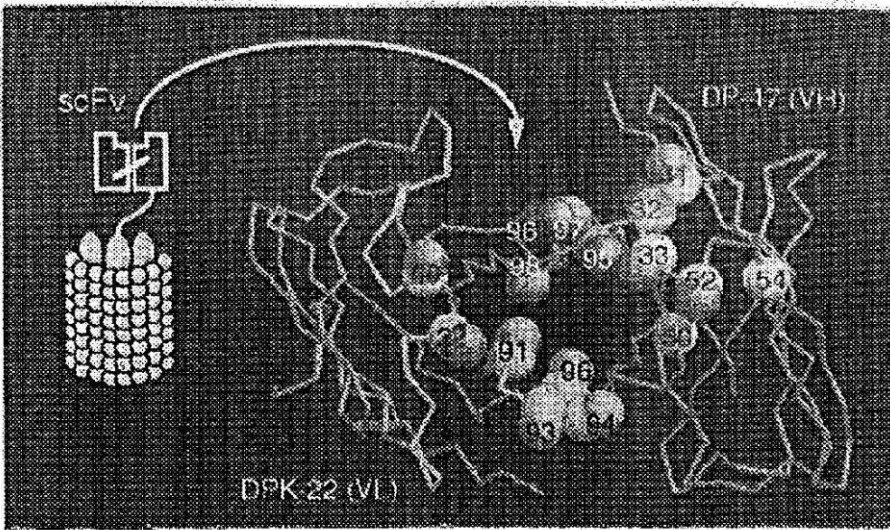
40

【 図 1 1 】

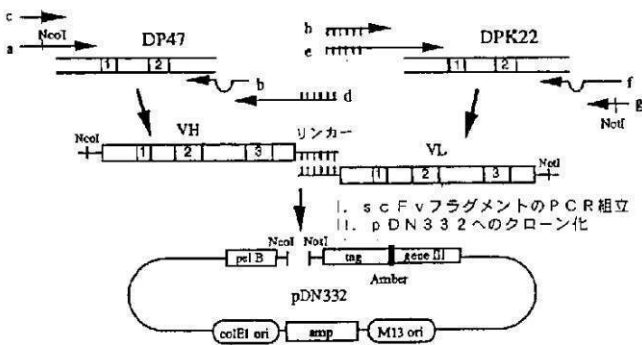


【 図 1 】

A)



B)



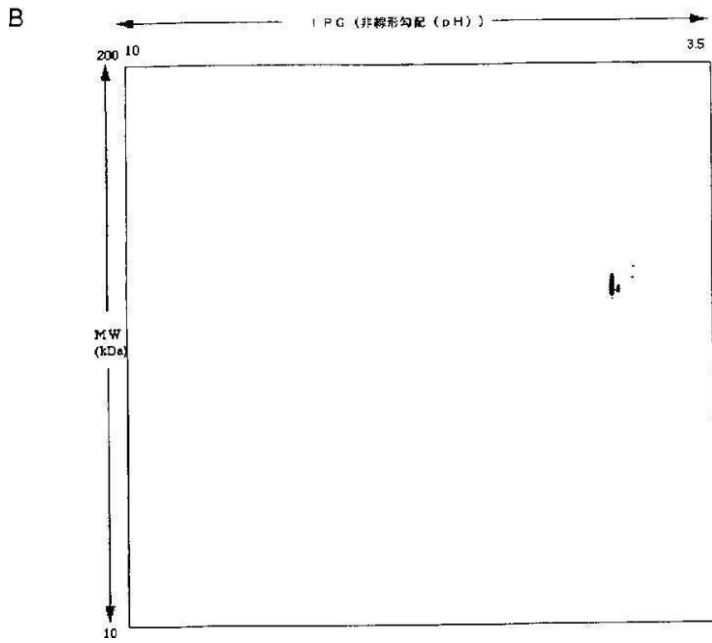
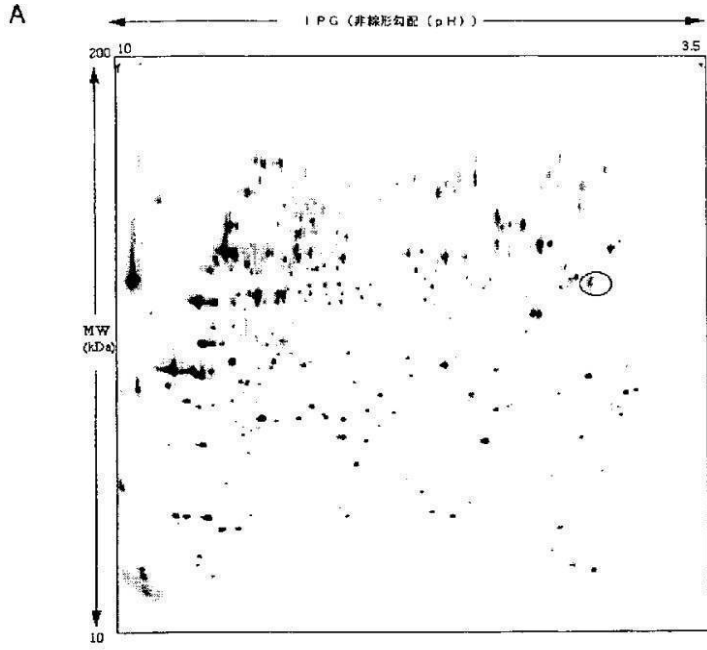
VHプライマー:

- a DP47baNcc GCG GCC CAG CAT GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG (SEQ ID NO:11)
- b CDR3for GGT TCC CTG GCC CCA GTA GTC AAA MNN MNN MNN MNN TTT CGC ACA GTA ATA TAC G (SEQ ID NO:12)
- c VHpullth GCG GCC CAG CAT GCC ATG GCC GAG (SEQ ID NO:13)
- d Jassm CCC GGT ACC GCC ACT GSA CCC ATC GCC ACT CGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC CTG GCC CCA GTA GTC (SEQ ID NO:14)

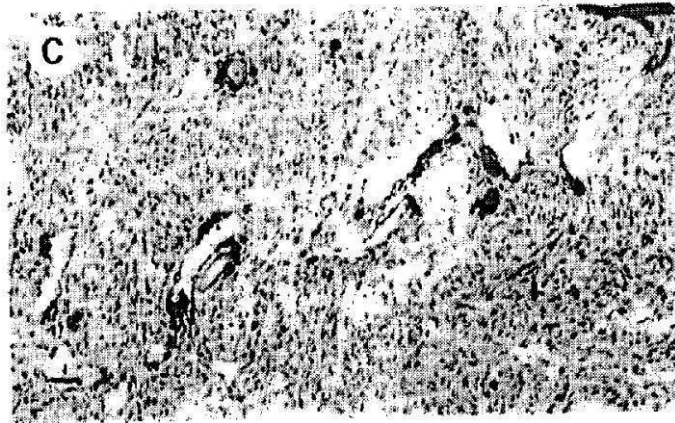
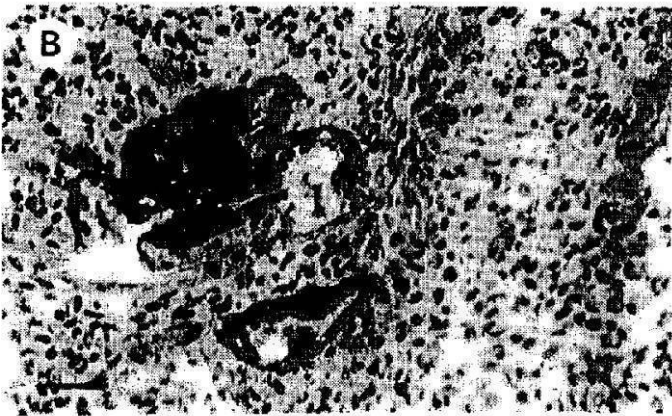
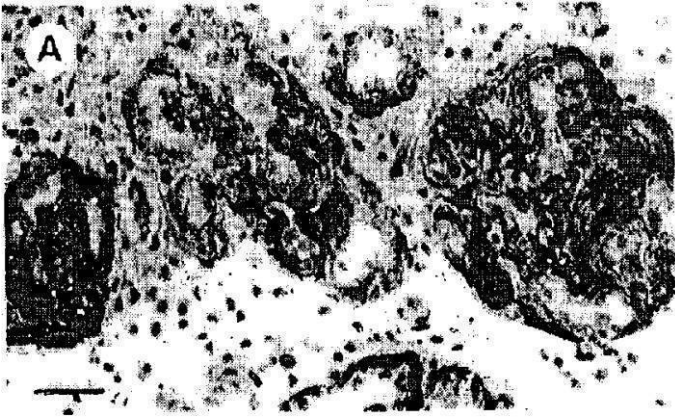
VLプライマー:

- e DPK22assm GAT GGG TCC AGT GGC GGT AGC GGG GGC GCG TCG ACT GGC GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CC (SEQ ID NO:15)
- f DPK3for CAC CTT GGT CCC TTG GCC GAA CGT MNN CGG MNN MNN ACC MNN CTG CTG ACA GTA ATA CAC TGC (SEQ ID NO:16)
- g Jfornt GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC TTT GAT TTC CAC CTT GGT CCC TTG GCC GAA CG (SEQ ID NO:17)
- h pullth GAT GGG TCC AGT GGC GGT AGC GGG (SEQ ID NO:18)

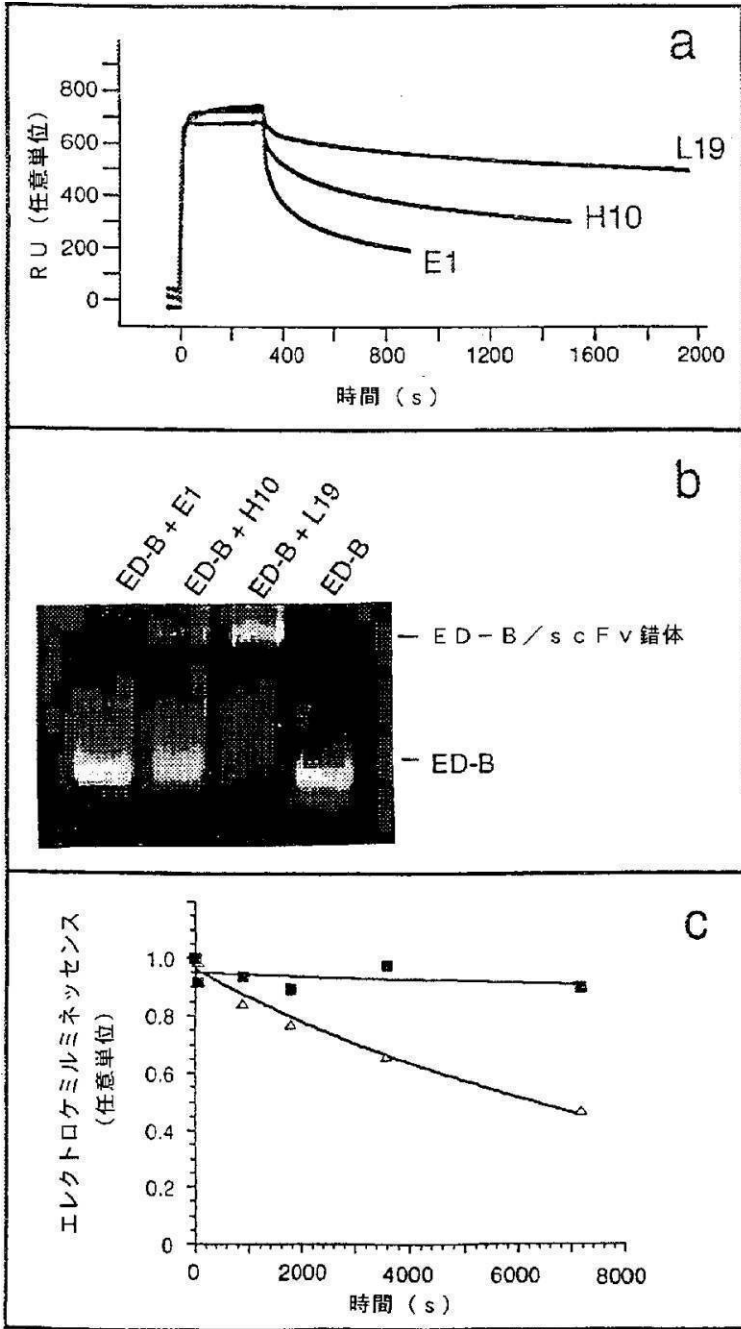
【 図 2 】



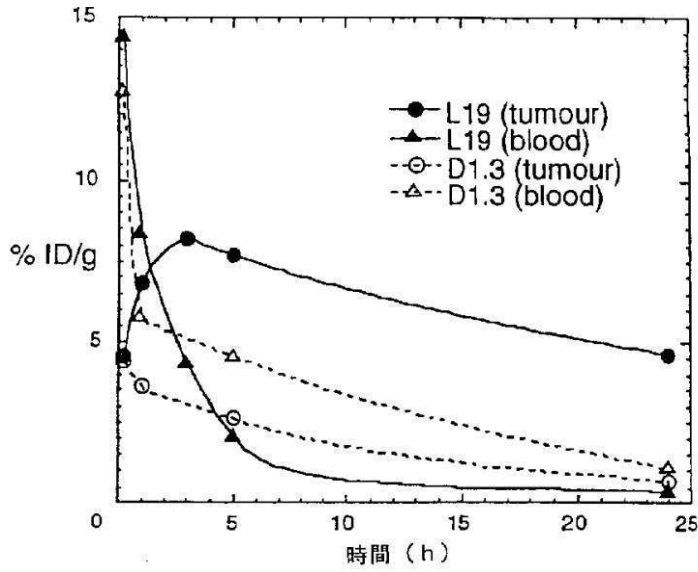
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



| 時間 (h) | s c F v ( L 1 9 ) |         |          |          |           |          |         | s c F v ( D 1 . 3 ) |         |
|--------|-------------------|---------|----------|----------|-----------|----------|---------|---------------------|---------|
|        | 腎臓                | 脾臓      | 肺        | 肝臓       | 脳         | 血液       | 腫瘍      | 血液                  | 腫瘍      |
| 0, 2 5 | 26.4±4.7          | 5.4±0.4 | 15.1±5.1 | 5.7±0.6  | 0.4±0.04  | 14.4±2.6 | 4.6±1.1 | 12.7±0.1            | 4.4±1.4 |
| 1      | 19.2±3.9          | 3.8±0.3 | 9.8±0.9  | 2.8±0.3  | 0.3±0.1   | 8.3±0.9  | 6.9±2.4 | 5.7±0.7             | 3.6±1.0 |
| 3      | 8.1±1.6           | 2.0±0.3 | 5.0±1.4  | 1.7±0.02 | 0.2±0.01  | 4.3±0.3  | 8.2±4.2 | -                   | -       |
| 5      | 4.2±0.1           | 1.8±0.2 | 3.5±0.2  | 1.3±0.3  | 0.1±0.02  | 2.1±1.6  | 7.7±2.5 | 4.6±1.2             | 2.6±1.5 |
| 2 4    | 0.7±0.1           | 0.4±0.1 | 1.0±0.3  | 0.2±0.04 | 0.02±0.01 | 0.4±0.1  | 4.7±0.6 | 1.1±0.5             | 0.7±0.4 |

【 6】

VH

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS  
 SFSMSWVRQA PGKGLEWVSS ISGSSGTTY  
 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED  
 TAVYYCAKPF PYFDYWGQGT LVTVSS

(SEQ ID NO:19)

リンカー

GDGSSGGSGGASTG

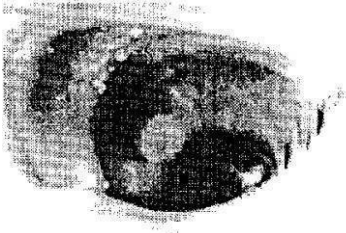
(SEQ ID NO:20)

VL

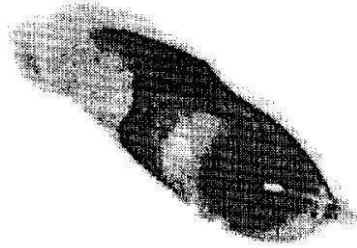
EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS  
 SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY YASSRATGIP  
 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYCCQ  
 QTGRIPPTFG QGTKVEIK

(SEQ ID NO:21)

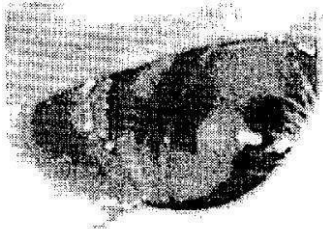
【 図 7 】



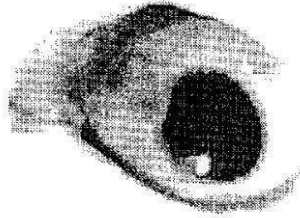
9日目/ラビット1/左/nC



9日目/ラビット1/右/VEGF



9日目/ラビット2/左/PMA



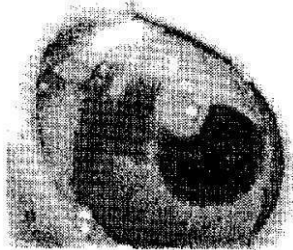
9日目/ラビット2/左/VEGF



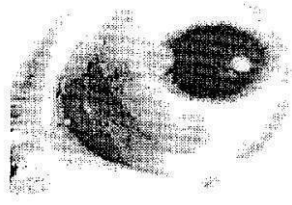
9日目/ラビット3/左/VEGF



9日目/ラビット3/右/PMA



9日目/ラビット4/左/PMA

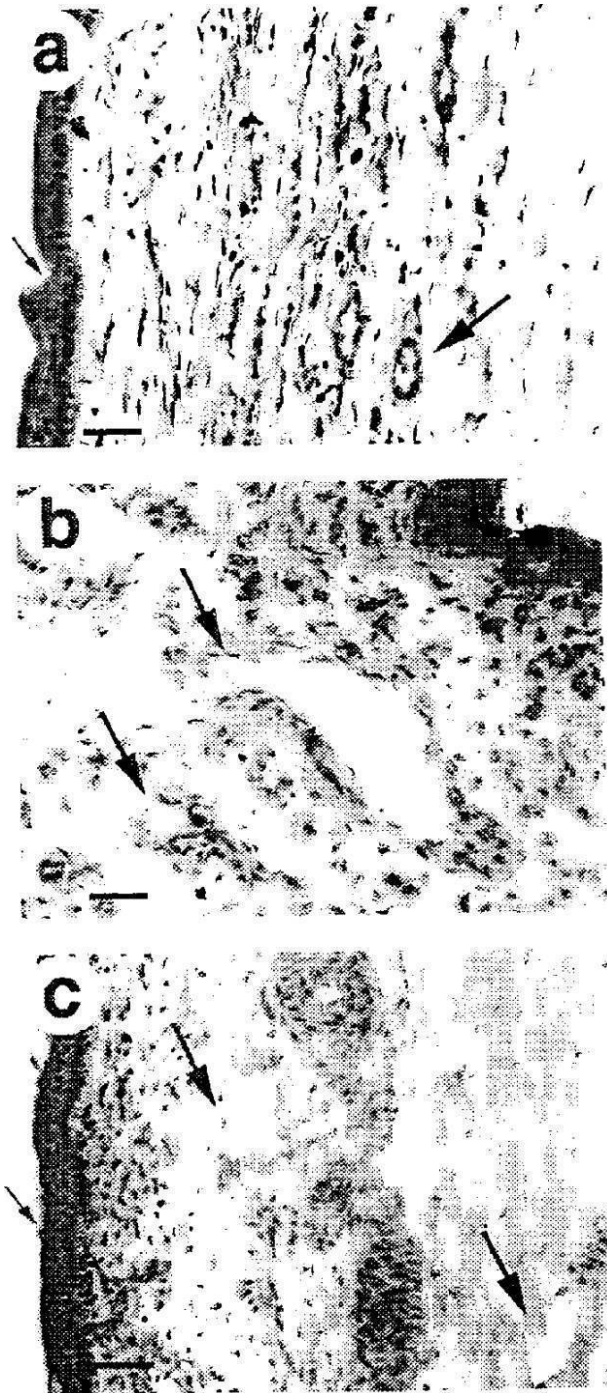


9日目/ラビット4/右/nC

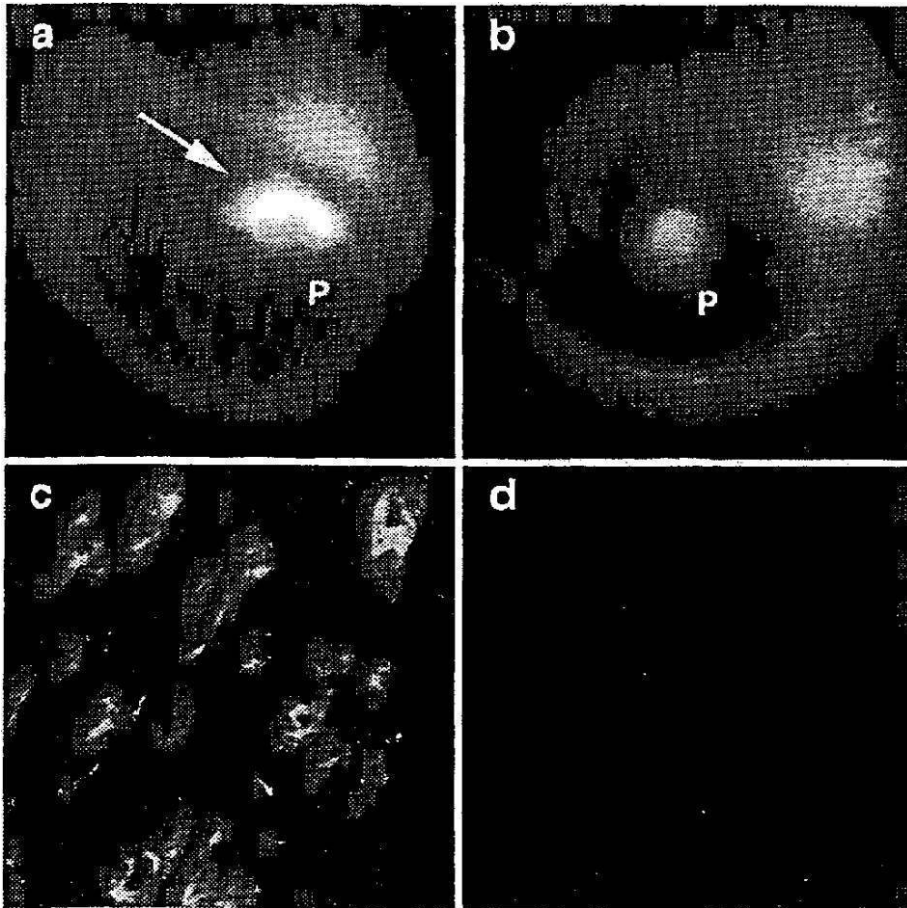
【 図 8 】



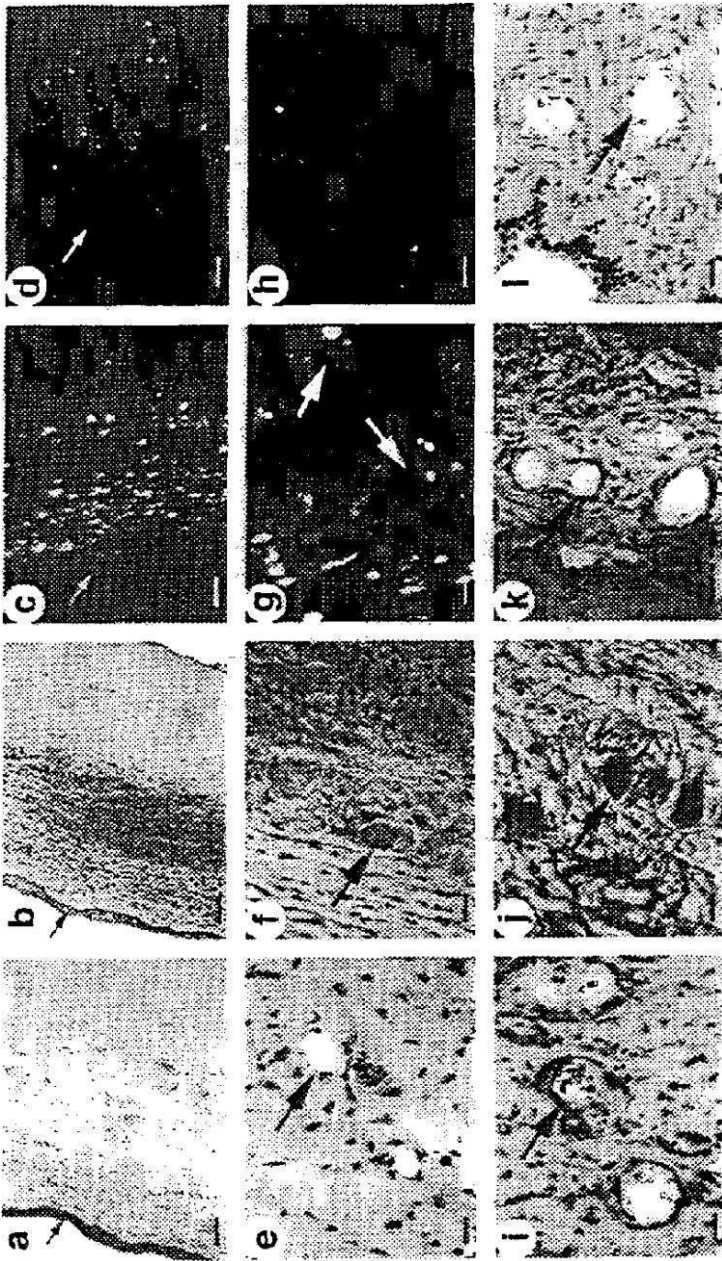
【 図 9 】



【 図 1 0 】



【 図 1 2 】



【 配列表 】

2009280607000001.app

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl.           |                  | F I     |        | テーマコード(参考) |
|-----------------------|------------------|---------|--------|------------|
| <b>A 6 1 P 27/02</b>  | <b>(2006.01)</b> | A 6 1 P | 9/00   |            |
| <b>G 0 1 N 33/574</b> | <b>(2006.01)</b> | A 6 1 P | 27/02  |            |
| <b>G 0 1 N 33/53</b>  | <b>(2006.01)</b> | A 6 1 K | 39/395 | E          |
|                       |                  | A 6 1 K | 39/395 | T          |
|                       |                  | G 0 1 N | 33/574 | A          |
|                       |                  | G 0 1 N | 33/53  | D          |

(72)発明者 ヴィチ・フランチェスカ

イタリア国、1 6 1 5 1 ジェノヴァ、ヴィア バッタグリニ 1 6

(72)発明者 ビルチェラー・マンフレッド

スイス国、ツェーハー - 8 0 0 4 ツリッヒ、アンヴァンドシュトラッセ 6 6

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 CA04 DA06 EA03 FA01 GA11 HA03 HA11  
 HA15  
 4C085 AA13 AA14 AA16 BB01 BB31 BB41 BB43 BB44 CC02 CC22  
 CC23 EE01 GG01  
 4H045 AA11 AA20 CA40 DA76 EA20 EA50 FA72 FA74

|             |   |         |            |
|-------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)     | 抗纤连蛋白的ED-B结构域的抗体，含有该抗体的结合物及其用于诊断和治疗肿瘤和血管生成相关疾病的用途   |         |            |
| 公开(公告)号     | <a href="#">JP2009280607A</a>   | 公开(公告)日 | 2009-12-03 |
| 申请号         | JP2009191668  | 申请日     | 2009-08-21 |
| 申请(专利权)人(译) | 眼捷基因津市惠Tehinisshe Hofushure Tsurihhi  |         |            |
| [标]发明人      | ネリダリオ<br>タレリロレンゾ<br>ヴィチフランチェスカ<br>ビルチェラーマンフレッド  |         |            |
| 发明人         | ネリ・ダリオ<br>タレリ・ロレンゾ<br>ヴィチ・フランチェスカ<br>ビルチェラー・マンフレッド  |         |            |
| IPC分类号      | C07K16/18 C12N15/09 A61K39/395 A61P35/00 A61P9/00 A61P27/02 G01N33/574 G01N33/53<br>A61K38/00 A61K47/48   |         |            |
| CPC分类号      | A61K38/00 A61K47/6843 A61P27/02 C07K16/18 C07K2317/21 C07K2317/565 C07K2317/622   |         |            |
| FI分类号       | C07K16/18.ZNA C12N15/00.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61P35/00 A61P9/00 A61P27/02 A61K39/395.E A61K39/395.T G01N33/574.A G01N33/53.D   |         |            |
| F-TERM分类号   | 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024/FA01 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA11 4B024/HA15 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB01 4C085/BB31 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB44 4C085/CC02 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 |         |            |
| 优先权         | 09/075338 1998-05-11 US<br>09/300425 1999-04-28 US  |         |            |
| 外部链接        | <a href="#">Espacenet</a>   |         |            |

摘要(译)

要解决的问题：产生对具有亚纳摩尔解离常数的纤连蛋白的ED-B结构域特异的抗体。解决方案：本发明涉及纤连蛋白的ED-B结构域的特殊表位，即具有对血管生成标志物特异的亚纳摩尔亲和力的抗体。此外，本发明涉及用于检测体内新形成的血管的辐射标记的抗-ED-B抗体和具有上述抗体的诊断试剂盒的应用。此外，本发明涉及含有抗体和合适的光学活性分子（例如，适当选择的光敏剂）的结合物和用于选择性光介导的新血管堵塞的应用。Z

【 図 1 1 】

