

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02002/057316

発行日 平成16年5月20日(2004.5.20)

(43) 国際公開日 平成14年7月25日(2002.7.25)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/09
A 6 1 K 39/395
A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 43/00

F I

C 1 2 N 15/00 A
A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 29/00 1 0 1
A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 43/00 1 0 5

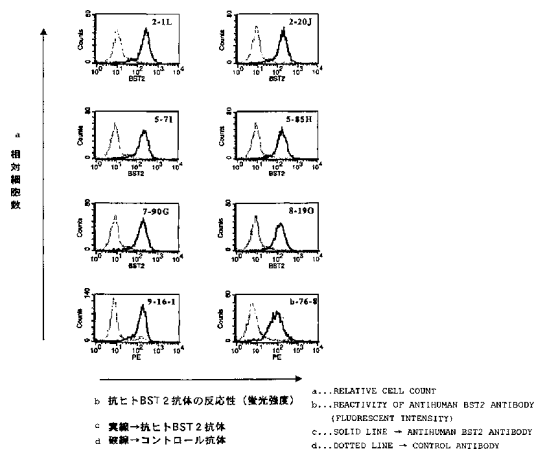
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 31 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2002-558389 (P2002-558389)	(71) 出願人	000253503 麒麟麦酒株式会社 東京都中央区新川二丁目10番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2001/011493	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(22) 国際出願日	平成13年12月26日(2001.12.26)	(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(31) 優先権主張番号	特願2000-403245 (P2000-403245)	(72) 発明者	田原 知幸 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内
(32) 優先日	平成12年12月28日(2000.12.28)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(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, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, 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, C H, 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, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, P T, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		

(54) 【発明の名称】 新規モノクローナル抗体

(57) 【要約】

細胞表面に存在するヒトBST2抗原に結合し、該細胞へのインターナリゼーションにより該細胞内部へ局在化しうることを特徴とするモノクローナル抗体又はその機能的断片、並びに該モノクローナル抗体又はその機能的断片と治療用薬剤とからなる複合体、及び該複合体を有効成分として含む医薬組成物。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞表面に存在するヒト B S T 2 抗原に結合し、該細胞へのインターナリゼーションにより該細胞内部へ局在化しうることを特徴とするモノクローナル抗体又はその機能的断片。

【請求項 2】

前記細胞が R P M I 8 2 2 6 株 (A T C C C C L - 1 5 5) であり、氷冷下で前記モノクローナル抗体を結合した後、37 にて培養開始後 120 分以内にインターナリゼーションが進行し、前記細胞表面上のヒト B S T 2 / 前記モノクローナル抗体複合体の存在量を示す蛍光物質の平均蛍光強度が、培養開始時の 50 % 以下を示すものである、請求項 1 記載のモノクローナル抗体又はその機能的断片。

10

【請求項 3】

前記細胞が R P M I 8 2 2 6 株であり、氷冷下で前記モノクローナル抗体を結合した後、37 にて培養開始後 90 分以内にインターナリゼーションが進行し、前記細胞表面上のヒト B S T 2 / 前記モノクローナル抗体複合体の存在量を示す蛍光物質の平均蛍光強度が、培養開始時の 50 % 以下を示すものである、請求項 1 記載のモノクローナル抗体又はその機能的断片。

【請求項 4】

前記細胞が R P M I 8 2 2 6 株であり、氷冷下で前記モノクローナル抗体を結合した後、37 にて培養開始後 60 分以内にインターナリゼーションが進行し、前記細胞表面上のヒト B S T 2 / 前記モノクローナル抗体複合体の存在量を示す蛍光物質の平均蛍光強度が、培養開始時の 50 % 以下を示すものである、請求項 1 記載のモノクローナル抗体又はその機能的断片。

20

【請求項 5】

前記細胞が R P M I 8 2 2 6 株であり、氷冷下で前記モノクローナル抗体を結合した後、37 にて培養開始後 30 分以内にインターナリゼーションが進行し、前記細胞表面上のヒト B S T 2 / 前記モノクローナル抗体複合体の存在量を示す蛍光物質の平均蛍光強度が、培養開始時の 50 % 以下を示すものである、請求項 1 記載のモノクローナル抗体又はその機能的断片。

【請求項 6】

前記細胞が R P M I 8 2 2 6 株であり、氷冷下で前記モノクローナル抗体を結合した後、37 にて培養開始後 15 分以内にインターナリゼーションが進行し、前記細胞表面上のヒト B S T 2 / 前記モノクローナル抗体複合体の存在量を示す蛍光物質の平均蛍光強度が、培養開始時の 50 % 以下を示すものである、請求項 1 記載のモノクローナル抗体又はその機能的断片。

30

【請求項 7】

配列番号 2 のアミノ酸番号 50 ~ 180 のアミノ酸配列中のエピトープを認識する、請求項 1 記載のモノクローナル抗体又はその機能的断片。

【請求項 8】

I g G 1 () 又は I g G 4 () である、請求項 1 記載のモノクローナル抗体又はその機能的断片。

40

【請求項 9】

ヒト抗体である、請求項 1 記載のモノクローナル抗体又はその機能的断片。

【請求項 10】

受託番号 F E R M B P - 7 4 1 7、F E R M B P - 7 4 1 8、F E R M B P - 7 8 2 1 又は F E R M B P - 7 8 2 2 のハイブリドーマにより産生される、請求項 1 記載のモノクローナル抗体又はその機能的断片。

【請求項 11】

受託番号 F E R M B P - 7 4 1 7、F E R M B P - 7 4 1 8、F E R M B P - 7 8 2 1 又は F E R M B P - 7 8 2 2 のハイブリドーマよりヒト抗体遺伝子をクローニングし、該遺伝子を発現可能な状態で宿主細胞に導入し、該宿主細胞を培養することにより取

50

得される、請求項 1 記載のモノクローナル抗体又はその機能的断片。

【請求項 1 2】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又はその機能的断片と、治療用薬剤とを結合したものである複合体。

【請求項 1 3】

治療用薬剤が、放射性核種、細菌毒素、化学療法剤及びプロドラッグから選ばれる少なくともひとつである、請求項 1 2 記載の複合体。

【請求項 1 4】

メイタンシン結合抗体である、請求項 1 3 記載の複合体。

【請求項 1 5】

請求項 1 2 又は請求項 1 3 記載の複合体を有効成分として含む、ヒト B S T 2 を発現する細胞を標的とする医薬組成物。

【請求項 1 6】

リンパ球性腫瘍、リウマチ又は原発性局所癌に適用するものである、請求項 1 5 記載の医薬組成物。

【請求項 1 7】

多発性骨髄腫に適用するものである、請求項 1 5 記載の医薬組成物。

【請求項 1 8】

ヒト B S T 2 抗原の少なくとも部分アミノ酸配列を含むポリペプチドを免疫した非ヒト動物の脾臓細胞とミエローマ細胞との融合によりハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマよりヒト B S T 2 抗原に結合する抗体を産生するハイブリドーマを選抜し、前記選抜されたハイブリドーマより産生されたヒト B S T 2 抗原に結合する抗体を、ヒト B S T 2 抗原を発現する細胞と反応させ、前記細胞を培養する過程で該細胞表面のヒト B S T 2 / 前記抗体複合体の存在量の低下を指標とした選抜を行うことを特徴とする、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体又はその機能的断片の作製方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、細胞表面に存在するヒト B S T 2 抗原を認識する抗体に関する。具体的には、本発明は該ヒト B S T 2 抗原に結合し該細胞へのインターナリゼーションにより該細胞内部へ局在化するモノクローナル抗体又はその機能的断片に関する。

本発明はまた、該モノクローナル抗体又はその機能的断片と、治療用試薬とを結合したものである複合体に関する。

背景技術

癌（腫瘍）は、わが国における死亡原因の第一位を占め、さらに患者数は年々増加してきており、有効性及び安全性の高い薬剤や治療法の開発が強く望まれている。造血器腫瘍の一つである多発性骨髄腫（multiple myeloma）は、B細胞の分化の最終段階に異常を来す不治のB細胞腫瘍である。臨床的には、多発性骨髄腫の経過は、末期の形質細胞性白血病（plasma cell leukemia）と類似しており、形質細胞のクローンの蓄積を特徴とする新生物で免疫グロブリン鎖の分泌を伴うことが多い。腫瘍による骨髄浸潤には貧血、低グロブリン血症及びバクテリア感染等の多数の合併症を伴った制御不能な骨髄腫細胞の増殖がみられる。また、多発性骨髄腫ではインターロイキン 6（IL 6）レベルが増大するが、骨の痛み、骨折及び低カルシウム血症を導く破骨細胞の増大をもたらす。高濃度の骨髄腫免疫グロブリン及び高カルシウム血症に関して、腎不全もともなうことも多い。

これまで多発性骨髄腫患者に対し種々の治療法が試みられてきたが、いまだ患者全体の臨床的効果は低い。化学療法はメルファラン及びプレドニゾロンを用いた多剤併用治療が標準的な治療であるが、約 2 年の中間的な持続とともに寛解の導入後再発して死亡する（Alexanian et al., New England J Medicine., 1994 Vol 330: 484）。また、これら薬剤は、腫瘍細胞だけに特異的に作用するのではなく、正常細胞に対しても毒性を示すため重篤な副作用が発現し、治療効果

10

20

30

40

50

にも限界がある。1980年代より造血幹細胞移植を併用した超大量化学療法が未だ活発に検討されているが臨床的な効果は低いままである。

正常細胞への毒性を低減するため、放射性核種や他の細胞毒性物質を結合したターゲッティング抗体の使用が試みられている (Goldenberg, Semin Nucl Med, 1989 Vol 19:332)。しかしながら、腫瘍細胞内部へターゲッティング抗体が取り込まれる割合は一般に低く、総注入量の0.01%から0.001%にすぎない (Vaughan et al., Brit J Radiol., 1987 Vol 60:567)。標的細胞内への迅速な局在化 (インターナリゼーション) 特性を併せもつ抗体を開発することにより、化学合成毒素、抗がん剤及び放射性核種などの治療用試薬との結合によりそれら細胞毒性物質の迅速な細胞内放出を達成でき、有効性の向上及び副作用が低減する可能性がある。

これまで多発性骨髄腫を対象とした抗体療法の試みが行われてきている。IL-6は多発性骨髄腫細胞の主要な増殖因子であると考えられ (Kawano et al., Nature, 1988 Vol 332:83; Klein et al., Blood, 1991 Vol 73:517)、IL-6シグナル伝達系を阻止することを目的とし、IL-6あるいはIL-6レセプターに対する中和抗体を用いた多発性骨髄腫患者の治療が試みられている。しかし、疾患の白血病変異を伴う患者において骨髄腫細胞の増殖抑制が観察されたものの、腫瘍が再発し臨床的な有効性は得られていない (Bataille et al., Blood, 1995 Vol 86:68; Van Zaanen et al., Br J Haematol., 1998 Vol 102:783; 日本臨床免疫学会会誌 1997 vol 20:87)。さらにCD19 (Grossbard et al., Br J Haematol., 1998 Vol 102:509)、CD20 (Hussein et al., Blood, 1999 Vol 94 [Suppl. 1]:313)、CD38 (Maloney et al., Semin Hematol., 1999 Vol 36 [Suppl. 3]:30)、CD54 (Huang et al., Cancer Res., 1995 Vol 55:610)、CD138 (Wijdenes et al., Br J Haematol., 1996 Vol 94:318)、Muc-1 (Treon et al., Blood, 1999 Vol 93:1287) 等の骨髄腫細胞発現抗原が、抗体療法の標的抗原の候補として報告されているがいまだ実用化には至っていない。

近年、骨髄腫細胞に高発現している抗原の一つとして、Bone marrow stromal antigen 2 (BST2、あるいはHM1.24抗原とも称される) が報告されている (Goto et al., Blood, 1994 Vol 84:1922; Ohtomo et al., Biochem Biophys Res Commun., 1999 Vol 258:583)。BST2は180アミノ酸残基からなる分子量約30kDaのtype II膜貫通糖タンパク質である。S-S結合によりホモダイマーを形成し細胞膜上に発現している。BST2タンパク質は、正常な末梢血細胞、骨髄細胞、反応性リンパ球、肝臓、腎臓、心臓等には発現しておらず、形質細胞と骨髄腫細胞に特異性高く発現している。詳細な生物学的活性は未だ不明であるが、BST2はB細胞の終末分化に関与するものと考えられている (Ishikawa et al., Genomics, 1995 Vol 26:527)。ヒトBST2に対する抗体については、ヒトBST2発現細胞株をマウス等の非ヒト哺乳動物に免疫することにより作製されたマウスモノクローナル抗体 (Goto et al., Blood, 1994 Vol 84:1922) が報告されている。また、このマウスモノクローナル抗体の可変領域とヒト免疫グロブリンの定常領域からなるキメラ抗体も報告されている (Ozaki et al., Blood, 1999 Vol 93:3922)。この抗体をヒト骨髄腫細胞を移植されたSCIDマウスに対して骨髄腫細胞の注入10日後に投与した場合、腫瘍増殖は抑制された (Ozaki et al., Blood, 1997 Vol 90:3179)。このようにBST2をターゲット抗原とした多発性骨髄腫の抗体療法は有望であることが予想される。また、BST2は、骨髄腫のみならず他のリンパ球系腫瘍

10

20

30

40

50

にも発現していることが報告されているため、抗BST2抗体療法はこれら腫瘍にも効果を発揮することが予想される。しかしながら、これら抗体は、抗体結合によるBST2 modulationを起こす活性はなく（尾崎ら 血液・腫瘍科、2000 Vol 41:128）、化学療法剤や放射性核種などの治療用試薬の有効性増加・副作用の低減が大いに期待できる迅速なインターナリゼーションを誘導する抗BST2抗体は未だ全く報告されていない。また、一般に細胞表面に発現する抗原蛋白質に結合し、当該細胞内部へのインターナリゼーションを誘導する抗体が取得されうることは知られているが、すべての細胞表面抗原についてそのような抗体が取得されるものであるかは必ずしも明らかではない。

発明の開示

本発明の目的は、ヒトBST2に結合でき、かつ、ヒトBST2を発現する腫瘍細胞等の細胞の内部への局在化（インターナリゼーション）誘導活性を併せ持つ抗体を開発することにより、現在治療困難な多発性骨髄腫等の疾患の治療のために新しい作用機序に基づく治療剤を提供することである。

本発明者らは、ヒトBST2に対する抗体の作製に関して鋭意研究した結果、標的細胞内への迅速なインターナリゼーション特性をもつ抗BST2抗体を取得することに成功し本発明を完成させた。本発明は下記の発明を包含する。

(1) 細胞表面に存在するヒトBST2抗原に結合し、該細胞へのインターナリゼーションにより該細胞内部へ局在化しうることを特徴とするモノクローナル抗体又はその機能的断片。

(2) 前記細胞がRPMI 8226株(ATCC CCL-155)であり、氷冷下で前記モノクローナル抗体を結合した後、37にて培養開始後120分以内にインターナリゼーションが進行し、前記細胞表面上のヒトBST2/前記モノクローナル抗体複合体の存在量を示す蛍光物質の平均蛍光強度が、培養開始時の50%以下を示すものである、(1)のモノクローナル抗体又はその機能的断片。

(3) 前記細胞がRPMI 8226株であり、氷冷下で前記モノクローナル抗体を結合した後、37にて培養開始後90分以内にインターナリゼーションが進行し、前記細胞表面上のヒトBST2/前記モノクローナル抗体複合体の存在量を示す蛍光物質の平均蛍光強度が、培養開始時の50%以下を示すものである、(1)のモノクローナル抗体又はその機能的断片。

(4) 前記細胞がRPMI 8226株であり、氷冷下で前記モノクローナル抗体を結合した後、37にて培養開始後60分以内にインターナリゼーションが進行し、前記細胞表面上のヒトBST2/前記モノクローナル抗体複合体の存在量を示す蛍光物質の平均蛍光強度が、培養開始時の50%以下を示すものである、(1)のモノクローナル抗体又はその機能的断片。

(5) 前記細胞がRPMI 8226株であり、氷冷下で前記モノクローナル抗体を結合した後、37にて培養開始後30分以内にインターナリゼーションが進行し、前記細胞表面上のヒトBST2/前記モノクローナル抗体複合体の存在量を示す蛍光物質の平均蛍光強度が、培養開始時の50%以下を示すものである、(1)のモノクローナル抗体又はその機能的断片。

(6) 前記細胞がRPMI 8226株であり、氷冷下で前記モノクローナル抗体を結合した後、37にて培養開始後15分以内にインターナリゼーションが進行し、前記細胞表面上のヒトBST2/前記モノクローナル抗体複合体の存在量を示す蛍光物質の平均蛍光強度が、培養開始時の50%以下を示すものである、(1)のモノクローナル抗体又はその機能的断片。

(7) 配列番号2のアミノ酸番号50~180のアミノ酸配列中のエピトープを認識する、(1)のモノクローナル抗体又はその機能的断片。

(8) IgG1()又はIgG4()である、(1)のモノクローナル抗体又はその機能的断片。

(9) ヒト抗体である、(1)のモノクローナル抗体又はその機能的断片。

10

20

30

40

50

(10) 受託番号 F E R M B P - 7 4 1 7、F E R M B P - 7 4 1 8、F E R M B P - 7 8 2 1 又は F E R M B P - 7 8 2 2 のハイブリドーマ(それぞれ 5 - 7 I、7 - 9 0 G、9 - 1 6 - 1 又は b - 7 6 - 8)により産生される、(1)のモノクローナル抗体又はその機能的断片。

(11) 受託番号 F E R M B P - 7 4 1 7、F E R M B P - 7 4 1 8、F E R M B P - 7 8 2 1 又は F E R M B P - 7 8 2 2 のハイブリドーマ(それぞれ 5 - 7 I、7 - 9 0 G、9 - 1 6 - 1 又は b - 7 6 - 8)よりヒト抗体遺伝子をクローニングし、該遺伝子を発現可能な状態で宿主細胞に導入し、該宿主細胞を培養することにより取得される、(1)のモノクローナル抗体又はその機能的断片。

(12) (1)から(11)のいずれかのモノクローナル抗体又はその機能的断片と、治療用薬剤とを結合したものである複合体。 10

(13) 治療用薬剤が、放射性核種、細菌毒素、化学療法剤及びプロドラッグから選ばれる少なくともひとつである(12)の複合体。

(14) (12)又は(13)の複合体を有効成分として含む、ヒト B S T 2 を発現する細胞を標的とする医薬組成物。

(15) リンパ球性腫瘍、リウマチ、又は原発性局所癌に適用するものである(14)の医薬組成物。

(16) 多発性骨髄腫に適用するものである(14)の医薬組成物。

(17) ヒト B S T 2 抗原の少なくとも部分アミノ酸配列を含むポリペプチドを免疫した非ヒト動物の脾臓細胞とミエローマ細胞との融合によりハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマよりヒト B S T 2 抗原に結合する抗体を産生するハイブリドーマを選抜し、前記選抜されたハイブリドーマより産生されたヒト B S T 2 抗原に結合する抗体を、ヒト B S T 2 抗原を発現する細胞と反応させ、前記細胞を培養する過程で該細胞表面のヒト B S T 2 / 前記抗体複合体の存在量の低下を指標とした選抜を行うことを特徴とする、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体又はその機能的断片の作製方法。 20

また、本発明は前記(1)から(11)のいずれかのモノクローナル抗体又はその機能的断片に、生物学的に活性な物質を化学的又は遺伝子工学的的手法により結合させることにより、ヒト B S T 2 を発現する細胞の内部へ前記生物学的に活性な物質を導入する方法をも提供する。「生物学的に活性な物質」とは、該物質が導入された細胞に対して何らかの生物学的変化、例えば 1 該細胞の増殖の促進又は抑制、 2 分化の促進若しくは抑制又は脱分化、 3 該細胞から他の細胞への信号伝達等の作用の変化、 4 細胞の死、などをもたらしうる物質のことを言う。具体的には、化学療法剤、放射性核種、細菌毒素、各種のサイトカイン類若しくはホルモン類、転写因子、糖鎖の合成若しくは分解に関連する酵素、又は細胞に対して前記機能を有する DNA 若しくは RNA などが挙げられる。本明細書で使用する用語の定義は以下のとおりである。 30

「ヒト B S T 2」とは、bone marrow stromal antigen 2 の略称であり、180アミノ酸残基からなる分子量約30kDaのタイプII膜貫通糖タンパク質で、ジスルフィド結合によりホモダイマーを形成し形質細胞、骨髄腫細胞等の細胞の細胞膜上に特異的に発現しているタンパク質をいう(例えば G o t o ら, 上記; O h t o m o ら, 上記)。 40

「インターナリゼーション」又は「迅速なインターナリゼーション」とは、一般に食作用(エンドサイトーシス: endocytosis)と称される機構のうち、細胞の非特異的なとりこみの飲作用などを示すのではなく、抗体が細胞表面抗原と免疫複合体を形成し、短時間で細胞内に取り込まれる現象を示す。例えば、反応条件や抗体・抗原の性質等により異なるが、一般に抗体がこの機序でとり込まれる場合、抗体と受容体の免疫複合体は、結合後エネルギー依存的に細胞表面を移動し、やがて一極に集中(キャッピング)したあと、1~数分、遅くとも12時間以内に細胞内に取り込まれる。細胞表面の抗原に結合し、インターナリゼーションにより細胞内に取り込まれる抗体を、本明細書では「インターナリゼーション誘導活性を有する抗体」と称することがある。

「細胞表面上のヒト B S T 2 / 前記モノクローナル抗体複合体の存在量を示す蛍光物質の 50

平均蛍光強度が、培養開始時の50%以下を示す」とは、ヒトBST2抗原を細胞表面に有する細胞を抗BST2抗体の存在下で培養する際に、培養開始時に細胞表面上のヒトBST2との免疫学的反応によって形成されたヒトBST2/モノクローナル抗体複合体の存在量100に対する一定時間経過後の該複合体の残存量の割合が50%以下であること、言い換えれば免疫学的複合体を形成する抗BST2抗体の50%以上がインターナリゼーションによって細胞内部にとり込まれたこと、を意味する。

「プロドラッグ」とは、生体内に投与されると内因性酵素等の作用によって活性型の薬剤に変換される前駆体薬剤をいう。

「化学療法剤」とは、腫瘍等に基因する疾患を患者に対し著しい障害を与えることなく病原に選択的に作用して治療する薬剤をいう。

本明細書又は図面においてアミノ酸を表記するために用いられるアルファベットの一字は、各々次に示すアミノ酸を意味する。

(G)グリシン、(A)アラニン、(V)バリン、(L)ロイシン、(I)イソロイシン、(S)セリン、(T)スレオニン、(D)アスパラギン酸、(E)グルタミン酸、(N)アスパラギン、(Q)グルタミン、(K)リジン、(R)アルギニン、(C)システイン、(M)メチオニン、(F)フェニルアラニン、(Y)チロシン、(W)トリプトファン、(H)ヒスチジン、(P)プロリン。またDNAを表記するために用いられるアルファベットの一字の意味は、各々次に示す。(A)アデニン、(C)シトシン、(G)グアニン、(T)チミン。

以下、本発明を詳細に説明する。

ヒトBST2は、公知の塩基配列又はアミノ酸配列(各々、配列番号1又は2)に基づいて、遺伝子組換え技術のほか、化学的合成法、細胞培養方法等のような技術的分野において知られる方法を適宜用いることにより製造することができる。またヒトBST2の部分配列は、後述する技術的分野において知られる方法に従って、遺伝子組換え技術又は化学的合成法により製造することもできるし、またヒトBST2をタンパク分解酵素等を用いて適切に切断することにより製造することができる。

本発明の抗体には、インターナリゼーション誘導特性を有することを特徴とする各種の抗ヒトBST2モノクローナル抗体が包含される。該抗体の例には、後述の実施例7から実施例15に記載されるような抗ヒトBST2モノクローナル抗体、あるいは、該抗体を構成する重鎖及び/又は軽鎖の各々のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する重鎖及び/又は軽鎖からなるモノクローナル抗体であって、インターナリゼーション誘導特性を有する抗体も包含される。本発明の抗体のアミノ酸配列中への、前記のようなアミノ酸の部分的改変(欠失、置換、挿入、付加)は、そのアミノ酸配列をコードする塩基配列を部分的に改変することにより導入することができる。この塩基配列の部分的改変は、既知の部位特異的変異導入法(Site specific mutagenesis)を用いて常法により導入することができる(Proc Natl Acad Sci USA, 1984 Vol 81: 5662; Sambrook et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual (1989) Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press)。本発明の抗体には、いずれのイムノグロブリンクラス及びサブクラスを有する抗体も包含するが、好ましくはヒトイムノグロブリンクラス及びサブクラスを有する抗体であり、好ましいクラス、サブクラスはイムノグロブリンG(IgG)、特にIgG1及びIgG4であり、好ましい軽鎖は である。

本発明の抗体又はその断片の好ましい例は、該抗体又はその断片を氷冷下で骨髓腫細胞株RPMI8226(ATCC CCL-155)に結合した後、37にて培養開始後約120分以内、好ましくは約90分以内、さらに好ましくは約60分以内、特に好ましくは約30分以内、さらに特に好ましくは約15分以内にインターナリゼーションが進行し、該細胞表面上のヒトBST2/抗BST2抗体複合体の存在量を示す蛍光物質の平均蛍光強度が、培養開始時の50%以下を示すものである。

10

20

30

40

50

本発明の抗体又はその断片の好ましい別の例は、ヒトBST2のアミノ酸配列（配列番号2）中の連続又は不連続の少なくとも8個のアミノ酸残基によって構成されるエピトープを認識し、かつ、インターナリゼーション誘導特性を有するモノクローナル抗体又はその断片からなる配列である。例えば配列番号2のアミノ酸番号10～180、20～180、30～180、40～180、50～180、50～170、50～160、50～150、50～140、50～130、50～120、50～110、50～100、50～90、50～80、50～70、50～60のアミノ酸配列中のエピトープを認識し、かつ、インターナリゼーション誘導特性を有するモノクローナル抗体又はその断片である。

本発明の抗体又はその断片の好ましいさらに別の例は、ヒトBST2及びサルBST2に対して交差反応を示す性質を有する抗体である。このような抗体は、ヒトBST2とサルBST2において、同一又は極めて類似したエピトープ構造を認識するものと想定され、ヒトに対する臨床試験に先立ちサルを実験動物とした種々の試験が可能であるという利点を有する。このような抗体の具体例は、ハイブリドーマ9-16-1（FERM BP-7821）又はハイブリドーマb-76-8（FERM BP-7822）の産生する抗体である。

本発明における抗体の断片とは、前記で定義した抗体の一部を意味し、具体的にはF(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、disulphide-linked Fv、Single-Chain Fv(scFv)及びこれらの重合体等が挙げられる(D. J. King, Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies, 1998 T. J. International Ltd)。このような抗体断片は慣用法、例えばパパイン、ペプシン等のプロテアーゼによる抗体分子の消化、あるいは公知の遺伝子工学的的手法により得ることができる。「機能的断片」とは、抗体が特異的に結合する抗原に対して、特異的に結合する抗体の断片を意味する。

本発明の抗体は、例えば、下記のような方法によって製造することができる。即ち、例えば、前記で定義したようなヒトBST2若しくはその一部、又は抗原の抗原性を高めるための適当な物質（例えば、bovine serum albumin等）との結合物、又はヒトBST2を細胞表面に多量に発現している細胞を、必要に応じて免疫賦活剤（Freund's Adjuvant等）とともに、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ等の非ヒト哺乳動物に免疫する。あるいは、BST2を組み込んだ発現ベクターを非ヒト哺乳動物に投与することにより免疫感作を行うことができる。モノクローナル抗体は、免疫感作動物から得た抗体産生細胞と自己抗体産生能のない骨髓腫系細胞（ミエローマ細胞）からハイブリドーマを調製し、ハイブリドーマをクローン化し、免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択し、さらに後述する方法によりインターナリゼーション誘導特性を有するクローンを選抜することによって製造される。また好ましくは、再配列されていないヒト抗体遺伝子を保持し、免疫感作により当該免疫原に特異的なヒト抗体を産生する非ヒト動物を用いることにより、本発明の抗体はヒト抗体であってもよい。ここで、ヒト抗体とは、ヒト由来の抗体遺伝子の発現産物である抗体、又はその機能的な断片を意味する。

さらに具体的には下記のようにして製造することができる。モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製は、ケーラー及びミルシュタインらの方法(Nature, 1975 Vol. 256: 495-497)及びそれに準じて行うことができる。即ち、前述の如く免疫感作された動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髓又は扁桃等、好ましくはリンパ節又は脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ又はヒト等の哺乳動物に由来する自己抗体産生能のないミエローマ細胞とを、細胞融合させることにより調製される。細胞融合は例えば、ポリエチレングリコール（例えば分子量1500～6000）等の高濃度ポリマー溶液中、通常約30～40、約1～10分間、抗体産生細胞とミエローマ細胞を混合することによって行うことができる。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは

10

20

30

40

50

、ハイブリドーマを、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェル中の培養上清の免疫抗原に対する反応性を、例えばELISA等の酵素免疫測定法、ラジオイムノアッセイ、蛍光抗体法などの免疫学的方法を用いて測定することにより行なうことができる。

ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロで培養して培養上清から単離することができる。また、マウス、ラット、モルモット、ハムスター又はウサギ等の腹水中等でのインビボで培養し、腹水から単離することもできる。

また、ハイブリドーマ等の抗体産生細胞からモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主（例えばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞等の哺乳類細胞株、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞など）に導入し、遺伝子組換え技術を用いて組換え抗体を調製することができる（P. J. Delves, ANTI BODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES, 1997 WILEY、P. Shepherd and C. Dean, Monoclonal Antibodies, 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS, J. W. Goding, Monoclonal Antibodies: principles and practice, 1993 ACADEMIC PRESS）。さらに、トランスジェニック動物作製技術を用いて目的抗体の遺伝子が内在性遺伝子に組み込まれたトランスジェニックなウシ、ヤギ、ヒツジ又はブタを作製し、そのトランスジェニック動物のミルク中からその抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である。ハイブリドーマをインビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特性、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地又は既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

産生されたモノクローナル抗体は、当該分野において周知の方法、例えばプロテインAカラムによるクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、硫酸塩析法、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィー等を適宜組み合わせることにより精製することができる。

上記の方法で作製された本発明のモノクローナル抗体又はその断片は、治療用薬剤とコンジュゲートすることによって、ミサイル療法等の治療目的に使用可能な複合体を形成できる。抗体へ結合させる治療用薬剤の例としては、以下のものに限定されないが、ヨード（ ^{131}I Iodine: ^{131}I , ^{125}I Iodine ^{125}I ）、イットリウム（ ^{90}Y Yttrium: ^{90}Y ）、インジウム（ ^{111}In Indium: ^{111}In ）、テクネチウム（ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Technetium: $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）等の放射核種（J. W. Goding, Monoclonal Antibodies: principles and practice, 1993 ACADEMIC PRESS）、緑膿菌毒素（Pseudomonas exotoxin）、ジフテリアトキシン（diphtheria toxin）、リシン（Ricin）のような細菌毒素、及びメトトレキサート（Methotrexate）、マイトマイシン（mitomycin）、カリキアマイシン（Calicheamicin）などの化学療法剤（D. J. King, Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies, 1998 T. J. International Ltd、M. L. Grossbard, Monoclonal Antibody - Based Therapy of Cancer, 1998 Marcel Dekker Inc）等が挙げられ、より好ましくは、抗体との結合によりプロドラッグ化できるメイタンシノイド（Maytansinoid）等がよい（Chariet al., Cancer Res., 1992 Vol 52: 127, Liu et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1996 Vol 93: 8681）。抗体と治療用薬剤の結合は共有又は非共有結合（例えばイオン結合）のいずれでもよい。例えば、抗体分子中の反応性基（例えばアミノ基、カルボキシル基、水酸基等）又は配位性基を利用し、必要に応

10

20

30

40

50

じてより反応性の基を結合するか又は反応性の基に変換した後、該反応性基と反応して結合を形成しうる官能基（細菌毒素、化学療法剤の場合）又は該配位性基との間で錯体を形成しうるイオン性基（放射性核種の場合）をもつ治療用薬剤と抗体とを接触させることによって、本発明の複合体を得ることができる。あるいは複合体の形成に際してピオチン-アビジン系の利用も可能であろう。また、治療用薬剤がタンパク質又はペプチドである場合は、遺伝子工学的手法により抗体と前記タンパク質又はペプチドとの融合タンパク質として生産することも可能である。

さらに具体的には、下記のようにしてメイタンシノイド (Maytansinoid) 化合物結合抗体を作製できる (Chariet al., Cancer Res., 1992 Vol 52: 127, U.S. Patent 5,208,020)。メイタンシン又は ansamitocin P-3 を、水素化リチウムアルミニウムにて還元し、メイタンシノールを調製する。調製されたメイタンシノールを、ジシクロヘキシルカルボジイミド、塩化亜鉛存在下にて、N-メチル-N-(メチルジチオプロパノイル)-L-アラニンとエステル化後、シリカゲルカラム等で精製し、メイタンシン誘導體 (May-SS-Me) を調製する。抗体を N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルチオ)プロピオン酸等又はスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸等と反応させ、抗体にそれぞれジチオピリジル基又はマレイミド基を導入する。May-SS-Me をジチオトレイトール等で還元し調製した May-SH を、ジチオピリジル基又はマレイミド基を導入した抗体と反応させ、メイタンシノイド化合物結合抗体を作製できる。

また、本発明の抗ヒトBST2抗体、あるいは上記治療用薬剤と結合した抗ヒトBST2抗体を含有する医薬組成物もまた本発明の範囲内に含まれる。該組成物には治療上有効量の治療用薬剤が含まれているべきであり、経口、非経口投与用の種々の形態に製剤化される。ここで、治療上有効量とは、所与の症状や投与計画について治療効果を与える量をいう。本発明の組成物は、抗体に加えて、生理学的に許容され得る製剤上の添加物、例えば希釈剤、保存剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバント、酸化防止剤、等張化剤、付形剤及び担体のうち1種又は複数を含むことができる。また、他の抗体又は抗生物質のような他の薬剤との混合物とすることもできる。適切な担体には、生理的食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水グルコース液、及び緩衝生理食塩水が含まれるが、これらに限定されるものではない。さらに当該分野において周知であるアミノ酸、糖類、界面活性剤等の安定化剤、表面への吸着防止剤を含んでいてもよい。製剤の形態としては、凍結乾燥製剤（この場合上記のような緩衝水溶液を添加することにより再構成して使用可能である。）、徐放製剤、腸溶性製剤、注射剤又は点滴剤などを含む製剤を、治療目的、治療計画に応じて選択可能である。

投与経路は、経口経路、並びに静脈内、筋肉内、皮下及び腹腔内の注射又は配薬を含む非経腸的経路が考えられるが、動物を用いた試験により最適の経路が選択される。あるいは、患者の患部に直接本発明の組成物を接触させる方法も可能であろう。投与量は、動物を用いた試験、臨床試験の実施により適宜決定されるが、一般に患者の状態若しくは重篤度、年齢、体重、性別などが考慮されるべきである。

本発明の抗体又は医薬組成物は、BST2を発現している細胞に起因する可能性を有する種々の疾患又は症状の治療又は予防への適用が可能である。その疾患又は症状としては、多発性骨髄腫等のリンパ球性腫瘍、リウマチなどが挙げられる。リウマチの場合、自己抗体産生細胞、すなわちBST2を発現している形質細胞（プラズマB細胞）に対して本発明の医薬組成物を選択的に作用させることができる。また、本発明のヒトモノクローナル抗体は、原発性の局所癌に罹患している患者の延命にも適用可能である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例を以て本発明をさらに詳細に説明するが、本発明がその実施例に記載される態様のみ限定されるものではない。

(実施例1) ヒトBST2発現ベクターの調製

完全長ヒトBST2 DNA (配列番号1) を、その5'末端にNot I配列を、その

10

20

30

40

50

3'末端にXba Iと終結コドンが付加するためにポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により修飾した。プライマー5'-AAGGAAAAAGCGGCCCGCGTGGAAATTCATGGCATCTAC-3'(配列番号3)及び5'-CTAGTCTAGATCATCACTGCAGCAGAGCGCTGAGG-3'(配列番号4)を使用し、KOD-Plus-(東洋紡社製)DNAポリメラーゼ及びヒト骨髄由来PolyA+RNA(Clontech社製)からSuperScriptII(Gibco-BRL社製)で合成したcDNA(約20ng)を鋳型として、94℃、15秒;50℃、30秒;及び68℃、1分間、30サイクルのPCR反応を行った。修飾されたBST2配列を、Not I-Xba I断片として単離し、そして同一酵素で開裂されていたpTracer-CMV(Invitrogen社製)ベクターにライゲートした。得られたプラスミドをpTracer-CMV/hBST2と命名した。

(実施例2)可溶性ヒトBST2発現ベクターの調製

可溶性BST2タンパク質をバキュロウイルスを用いた発現系にて以下の方法にて調製した。54-180のアミノ酸配列を持つBST2部分ペプチド(配列番号2のアミノ酸番号54~180)のN末端にFLAG(N末端-DYKDDDDK-C末端、Brizzard et al., Biotechniques(1994)16:730)(FLAG-sBST2)、N末端にFLAG及びC末端にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST、Smith et al., Gene(1988)67:31)(FLAG-sBST2-GST)を付けた2種類の可溶性BST2発現プラスミドを作製した。FLAG-sBST2ベクターは、5'末端に分泌シグナル配列、FLAGコドンが付加するために5'末端BglII配列、3'末端BamHI配列からなる下記のDNA配列

5'-AGATCTATGAAATTCCTTAGTCAACGTTGCCCCCTTGTTTTATGGTCGTATACATTTCTTACATCTATGCGGATCGAGACTACAAGGATGACGATGACAAGGGATCC-3'(配列番号5)のcDNAを合成した(Signal-Flag断片)。5'末端BamHI配列、sBST2領域、終結コドン、3'末端にNotI配列を付加するため、プライマー5'-CGAGGATCCCATATGCGGGACGGCCTTCGGGC-3'(配列番号6)及び5'-AAGGAAAAAGCGGCCCGCTCACTGCAGCAGAGCGCTGAGG-3'(配列番号7)を使用してPCRにより修飾した。PCRを、EX-Taqポリメラーゼ(宝酒造株式会社)及び約20ngのヒト脾臓由来1st strand DNA(Clontech社製)を使用して、35サイクルの、94℃、30秒;56℃、30秒;及び72℃、1分間をもって反応させた。修飾されたBST2配列を、BamHI-NotI断片として単離した。そしてSignal-Flag断片とBamHI-NotI断片をBglIIとNotI酵素で開裂したpFastBac1(GIBCO社製)ベクターにライゲートした。得られたプラスミドをpFastBac1/FBST2と命名した。

同様にFLAG-sBST2-GSTは、5'末端にBamHI配列を、3'末端にNotI配列を付加するため、プライマー5'-CGAGGATCCCATATGCGGGACGGCCTTCGGGC-3'(配列番号6)及び5'-AAGGAAAAAGCGGCCCGCTGCAGCAGAGCGCTGAGG-3'(配列番号7)を使用してPCRにより修飾した。PCRは、EX-Taqポリメラーゼ(宝酒造株式会社)及び20ngのpFastBac1/FBST2を使用して、30サイクルの、94℃、30秒;56℃、30秒;及び72℃、1分間をもって反応させた。修飾されたBST2配列を、BamHI-NotI断片として単離した。また、GSTと終結コドン配列を付加するため、5'末端にNotI配列を、3'末端にKpnI配列を付加するため、プライマー5'-AAGGAAAAAGCGGCCCGCTGGAAGTTCTGTTCAGGGGCCCATGTCCCTATACTAGGTTATTGG-3'(配列番号8)及び5'-CGGGGTACCTCAATCCGATTTTGGAGGATGGTCGCC-3'(配列番号9)を使用してPCRにより修飾した。PCRは、EX-Taqポリメラーゼ(宝酒造株式会社)及び20ngのpGEXプラスミド(Amersham Ph

armacia Biotech社製)を使用して、30サイクルの、94、30秒；56、30秒；及び72、1分間をもって反応させた。修飾されたGST配列をNotI-KpnI断片として単離し、前述のBamHI-NotI断片とNotI-KpnI断片を、BamHI-KpnIで開裂したpFastBac1/FBST2ベクターにライゲートした。得られたプラスミドをpFastBac1/FBST2/GSTと命名した。

(実施例3)組換体発現ウイルスの調製

組換体ウイルスの作製は実施例2で作製された発現ベクターとGIBCOBRL社製BAC-TO-BAC Baculovirus Expression Systemを用いてマニュアルの方法にて行った。得られた組換体バキュロウイルスは、 3×10^6 個のSf9細胞(Invitrogen社製)5mlに組換体バキュロウイルス含有上清を0.3ml添加し、フラスコ(T-Flask 25cm², CORNING社製)で4日間、27で培養後、培養上清を回収し、組換体バキュロウイルスの増幅を行った。目的のウイルス量が得られるまで同様な操作を行った。

10

(実施例4)可溶性ヒトBST2の発現

可溶性BST2の大量発現は、800mlのHiFiveTM細胞(1×10^6 /ml, Invitrogen社製)に実施例3で作製された80mlのウイルスを加え、27で60時間培養し、培養上清を回収した。回収した上清は、遠心後、0.2µmのPE5フィルター(CORNING社製)に供し、細胞等の雑排物を除去した。

20

(実施例5)可溶性ヒトBST2の精製

実施例4で作製された培養上清からの可溶性BST2(FLAG-sBST2, FLAG-sBST2-GST)の精製は以下の方法で行った。可溶性BST2を含む培養上清をFLAG M2アフィニティ カラム(SIGMA社製)を用い、付属の説明書に従い吸着緩衝液としてPBS(-)、溶出緩衝液として0.1Mグリシン-塩酸緩衝液(pH3)を用いてアフィニティー精製した。溶出画分は1M Tris-HCl(pH8.0)を添加してpH7.2付近に調整した。調製された抗体溶液は、透析膜(10000カット, Spectrum Laboratories社製)を用いてPBS(-)に置換し、孔径0.22µmのメンブランフィルターMILLEX-GV(MILLIPORE製)でろ過滅菌し、SDS/PAGE電気泳動で単一バンドの精製FLAG-sBST2, FLAG-sBST2-GSTを得た。

30

(実施例6)ヒト抗体産生マウスの作製

免疫に用いたマウスは、内因性Ig重鎖破壊及び軽鎖破壊の両者についてホモ接合体の遺伝的背景を有しており、かつヒトIg重鎖遺伝子座を含む14番染色体断片(SC20)及びヒトIg鎖トランスジーン(KCo5)を同時に保持する。このマウスは、ヒトIg重鎖遺伝子座を持つ系統(系統A)のマウスと、ヒトIg鎖トランスジーンを持つ系統(系統B)のマウスとの交配により作製した。系統Aは、内因性Ig重鎖及び軽鎖破壊の両者についてホモ接合体であり、子孫伝達可能な14番染色体断片(SC20)を保持するマウス系統であり、例えば富塚らの報告(Tomizuka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000 Vol 97: 722)に記載されている。また、系統Bは、内因性Ig重鎖及び軽鎖破壊の両者についてホモ接合体であり、ヒトIg鎖トランスジーン(KCo5)を保持するマウス系統であり、例えばFishwildらの報告(Nat. Biotechnol., 1996 Vol 14: 845)に記載されている。系統Aの雄マウスと系統Bの雌マウス、あるいは系統Aの雌マウスと系統Bの雄マウスの交配により得られた、血清中にヒトIg重鎖及び軽鎖が同時に検出される固体(Ishida & Lonberg, IBC's 11th Antibody Engineering, Abstract 2000)を以下の免疫実験に用いた。なお、前記ヒト抗体産生マウスは、契約を結ぶことによって、麒麟麦酒株式会社より入手可能である。

40

(実施例7)ヒトBST2に対するヒトモノクローナル抗体の調製

本実施例におけるモノクローナル抗体の作製は、単クローン抗体実験操作入門(安東民衛

50

ら著作、講談社発行(1991)等に記載されるような一般的方法に従って調製した。免疫原としてのヒトBST2は、実施例1で調製したpTracer-CMV/hBST2ベクターと実施例5で調製したFLAG-sBST2を用いた。被免疫動物は、実施例6で作製したヒト免疫グロブリンを産生するヒト抗体産生マウスを用いた。

ヒト抗体産生マウスに、実施例1で作製したpTracer-CMV/hBST2ベクター(10 μ g/匹)をTransITTMIn Vivo Gene Delivery System試薬(宝酒造株式会社製)を用いて導入・発現することにより初回免疫した。初回免疫から同ベクターを1週間毎に3回導入・発現し追加免疫した。さらに、実施例5で作製したFLAG-sBST2(10 μ g)を尾静脈内注射により追加免疫し、さらに以下に述べる脾臓細胞の取得3日前にFLAG-sBST2(10 μ g)を同様にして免疫した。

免疫されたマウスから脾臓を外科的に取得し、回収した脾臓細胞をマウスミエローマSP2/0(ATCC No.:CRL1581)と5:1で混合し、融合剤としてポリエチレングリコール1500(Boehringer Mannheim社製)を用いて細胞融合させることにより多数のハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマの選択は、10%のウシ胎児血清(Fetal Calf Serum、FCS)とヒポキサンチン(H)、アミノプテリン(A)、チミジン(T)を含有するHAT含有DMEM培地(Gibco BRL社製)中で培養することにより行った。さらに、HT含有DMEM培地を用いて限界希釈法によりシングルクローンにした。培養は、96-wellマイクロタイタープレート(ベクtonディッキンソン社製)中で行った。抗ヒトhBST2ヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンの選択(スクリーニング)及び各々のハイブリドーマが産生するヒトモノクローナル抗体の特徴付けは、後述する酵素標識免疫吸着アッセイ(ELISA)及び蛍光活性化セルソーター(FACS)により測定することにより行った。

ヒトモノクローナル抗体産生ハイブリドーマのELISAによるスクリーニングは、以下に述べる3種類のELISA及びFACS解析により、ヒト免疫グロブリン鎖(hIg)及びヒト免疫グロブリン軽鎖を有し、かつヒトhBST2に特異的な反応性を有するヒトモノクローナル抗体を産生する多数のハイブリドーマを得た。なお、本実施例を含め以下のいずれの実施例中、並びに実施例における試験結果として示した表又は図中においては、各々の本発明のヒト抗ヒトhBST2モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンは記号を用いて命名した。以下のハイブリドーマクローンはシングルクローンを表わす:2-1L, 2-20J, 5-7I, 5-85H, 7-90G、8-190、b-76-8又は9-16-1。

それらの内4つのハイブリドーマクローン5-7I、7-90G、9-16-1及びb-76-8を、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)にブダペスト条約の規定下で国際寄託した。ハイブリドーマクローン5-7I及び7-90Gは各々受託番号FERM BP-7417、FERM BP-7418であり(平成12年12月26日付)、ハイブリドーマクローン9-16-1及びb-76-8は各々受託番号FERM BP-7821及びFERM BP-7822である(平成13年12月7日付)。

(実施例8)ヒト免疫グロブリン鎖を有するモノクローナル抗体の検出

実施例5で作製したFLAG-sBST2-GST(1 μ g/ml 50mM Na₂HCO₃, 50 μ l/ウェル)を、ELISA用96穴マイクロプレート(Maxisorp、Nunc社製)の各ウェルに加え、室温で30分インキュベートし、FLAG-sBST2-GSTをマイクロプレートに吸着させた。次いで、上清を捨て、各ウェルにブロッキング試薬(SuperBlockTM Blocking Buffer, PIERCE社製)を加え室温で10分間インキュベートし、FLAG-sBST2-GSTが結合していない部位をブロックした。このようにして、各ウェルをFLAG-sBST2-GSTでコーティングしたマイクロプレートを作製した。

各ウェルに、各々のハイブリドーマの培養上清(50 μ l)を加え、室温下で30分反応

10

20

30

40

50

させた後、各ウェルを、0.1% Tween 20 含有リン酸緩衝液 (PBS-T) で2回洗淨した。次いで、過酸化酵素で標識されたヤギ抗ヒトIgG F(ab')₂ 抗体 (Biosource International社製) を10% ブロックエース (大日本製薬株式会社製) 含有PBS-Tで2,000倍に希釈した溶液 (50 µl / ウェル) を、各ウェルに加え、室温下30分インキュベートした。マイクロプレートを、PBS-Tで3回洗淨後、発色基質液 (TMB)、100 µl / ウェル、DAKO社製) を各ウェルに加え、室温下で20分間インキュベートした。各ウェルに、2M硫酸 (50 µl / ウェル) を加え、反応を止めた。波長450 nm (参照波長570 nm) での吸光度をマイクロプレートリーダー (MTP-300, コロナ電気社製) で測定した。その結果、300クローン以上の抗ヒトBST2抗体が取得できた。その一部を表1に示す。

10

(実施例9) ヒト免疫グロブリン軽鎖 (Ig L) を有するモノクローナル抗体の検出
 実施例5で作製したFLAG-sBST2-GST (1 µg / ml 50 mM Na₂ HCO₃, 50 µl / ウェル) を、ELISA用96穴マイクロプレート (Maxisorp, Nunc社製) の各ウェルに加え、室温で30分インキュベートし、FLAG-sBST2-GSTをマイクロプレートに吸着させた。次いで、上清を捨て、各ウェルにブロッキング試薬 (SuperBlockTM Blocking Buffer, Pierce社製) を加え室温で10分間インキュベートした。各ウェルを、PBS-Tで2回洗淨した。FLAG-sBST2-GSTをコーティングしたマイクロプレートの各ウェルに、各々のハイブリドーマの培養上清 (50 µl) を加え、30分反応させた後、各ウェルを、PBS-Tで2回洗淨した。次いで、各ウェルに、過酸化酵素で標識したヤギ抗ヒトIg抗体 (2,000倍希釈、50 µl / ウェル、Biosource International社製) を加え、室温下で30分間インキュベートした。PBS-Tで3回洗淨後、基質緩衝液 (TMB、100 µl / ウェル、DAKO社製) を各ウェルに加え、室温下で20分間インキュベートした。次いで、2M硫酸 (50 µl) を各ウェルに加え、反応を止めた。波長450 nm (参照波長570 nm) での吸光度をマイクロプレートリーダー (MTP-300, コロナ電気社製) で測定した。その結果を表1に示す。

20

表 1

クローン	サブクラス	FLAG-sBST2-GST ELISA (A_{450nm}/A_{570nm})
2-1L	IgG4 (κ)	0.649
2-20J	IgG1 (κ)	0.637
5-7I	IgG1 (κ)	0.536
5-85H	IgG1 (κ)	0.552
6-26H	IgG4 (κ)	1.040
7-90G	IgG1 (κ)	0.325
8-19O	IgG1 (κ)	0.515
b-76-8	IgG1 (κ)	0.823
9-16-1	IgG4 (κ)	0.741
Control	IgG1 (κ)	0.014
Control	IgG4 (κ)	0.013

30

40

(実施例10) 各モノクローナル抗体のサブクラス同定
 実施例5で作製したFLAG-sBST2-GST (1 µg / ml 50 mM Na₂ HCO₃, 50 µl / ウェル) を、ELISA用96穴マイクロプレート (Maxisorp, Nunc社製) の各ウェルに加え、室温で30分インキュベートし、FLAG-sBST2-GSTをマイクロプレートに吸着させた。次いで、上清を捨て、各ウェルにブロッキング試薬 (SuperBlockTM Blocking Buffer, Pierce社製) を加え室温で10分間インキュベートした。各ウェルを、PBS-Tで2回洗淨した。FLAG-sBST2-GSTをコーティングしたマイクロプレートの各ウェル

50

に、各々のハイブリドーマの培養上清(50 µl)を加え、30分反応させた後、各ウェルを、PBS-Tで2回洗浄した。次いで、各ウェルに、それぞれ過酸化酵素で標識したヒツジ抗ヒトIgG1抗体、ヒツジ抗ヒトIgG2抗体、ヒツジ抗ヒトIgG3抗体又はヒツジ抗ヒトIgG4抗体(各2,000倍希釈、50 µl/ウェル、The Binding Site社製)を加え、室温下で30分間インキュベートした。PBS-Tで3回洗浄後、基質緩衝液(TMB、100 µl/ウェル、DAKO社製)を各ウェルに加え、室温下で20分間インキュベートした。次いで、2M硫酸(50 µl)を各ウェルに加え、反応を止めた。波長450 nm(参照波長570 nm)での吸光度をマイクロプレートリーダー(MTP-300, コロナ電気社製)で測定した。その結果を表1に示した。

(実施例11) hBST2発現細胞に対する各モノクローナル抗体の反応試験

BST2が発現していると報告されている骨髄腫由来細胞株RPMI8226(ATCC CCL-155, Goto et al., Blood, 1994 Vol 84: 1922; Ohtomo et al., Biochem Biophys Res Commun., 1999 Vol 258: 583)に対する各モノクローナル抗体の反応性の検討をFACS解析で行った。2 x 10⁶/mlの濃度でRPMI8226細胞株を1%ウサギ血清入り、0.1%NaN₃、2%FCS含有PBSのStaining Buffer(SB)に浮遊させた。細胞浮遊液(100 µl/ウェル)を96-well丸底プレート(ベクトンディッキンソン社製)に分注した。各々のハイブリドーマの培養上清(50 µl)を加え、氷温下30分間インキュベートした。陰性コントロールは各サブクラスに応じ、ヒトIgG1抗体(シグマ社製)又はヒトIgG4抗体(シグマ社製)を用い、ハイブリドーマ培養培地で2 µg/mlの濃度に調製し、50 µl添加後氷温下30分間インキュベートした。SBで2回洗浄した後、0.0125 mg/mlのRPE蛍光標識ウサギ抗ヒトIgG(LF(ab')₂抗体(DAKO社製)30 µlを加え、氷温下30分間インキュベートした。SBで2回洗浄した後、300 µlのFACS緩衝液に懸濁し、FACS(FACSscan、ベクトンディッキンソン社製)で各細胞の平均蛍光強度を測定した。その結果、何れの抗体もRPMI8226細胞株に強い結合活性を有する抗体であることがわかった(図1)。

(実施例12) 各抗体の調製

抗BST2抗体を含む培養上清の調製は以下の方法にて行った。抗BST2抗体産生ハイブリドーマをウシインシュリン(5 µg/ml, Gibco BRL社製)、ヒトトランスフェリン(5 µg/ml, Gibco BRL社製)、エタノールアミン(0.01 mM、シグマ社製)、亜セレン酸ナトリウム(2.5 x 10⁻⁵ mM、シグマ社製)含有ERDF培地(極東製薬社製)に馴化した。スピナ-プラスチックにて培養し、ハイブリドーマの生細胞率が90%になった時点で培養上清を回収した。回収した上清は、10 µmと0.2 µmのフィルター(ゲルマンサイエンス社製)に供し、ハイブリドーマ等の雑排物を除去した。

上記培養上清からの抗BST2抗体の精製は以下の方法で行った。抗BST2抗体を含む培養上清をHyper D Protein Aカラム(日本ガイシ製)を用い、付属の説明書に従い吸着緩衝液としてPBS(-)、溶出緩衝液として0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液(pH3)を用いてアフィニティー精製した。溶出画分は1 M Tris-HCl(pH8.0)を添加してpH7.2付近に調整した。調製された抗体溶液は、透析膜(10000カット、Spectrum Laboratories社製)を用いてPBS(-)に置換し、孔径0.22 µmのメンブランフィルターMILLEX-GV(MILLIPORE製)でろ過滅菌し、精製抗BST2抗体を得た。精製抗体の濃度は280 nmの吸光度を測定し、1 mg/mlを1.45 ODとして算出した。

(実施例13) 抗BST2抗体の蛍光標識

抗BST2抗体の蛍光標識化は以下の方法で行った。Alexa FluorTM 488(Molecular Probes社製)を付属の説明書に従い、実施例12で調製した抗BST2抗体に結合させた。2 mg/mlの抗BST2抗体0.5 mlに50 µlの1 M炭酸緩衝液を添加後、Alexa FluorTM 488と混合し、攪拌しながら室

10

20

30

40

50

温1時間反応させた。ヒドロキシルアミンを添加し反応を止め、ゲルろ過カラム(NAP 5、Amersham Pharmacia Biotech社製)に混合液を供し、抗体に未結合のAlexa FluorTM 488を除去した。この条件で抗体1分子に6つの蛍光物質が結合した。蛍光標識された抗体はRPMI 8226に結合し、その結合活性は標識されていない抗体と同等であった。

(実施例14)各抗BST2抗体の交叉反応性

各モノクローナル抗体のマウス及びアカゲザルの血液細胞への交叉反応性をFACS解析で調べた。1mLヘパリン(Novo社製)入りヒト末梢血10mL、あるいはアカゲザル末梢血10mLを10mLのPBS(-)で2倍に希釈し、20mLのFicoll-Paque PLUS液(Amersham Pharmacia Biotech社製)上に重層した。1500 r.p.m.で30分間遠心後、単核球画分を回収しPBS(-)で2回洗浄した。マウスの血液細胞は、以下のように調製した。EDTAコートした試験管に、眼窩採血により末梢血50 μ Lを採取した。さらに滅菌水を300 μ L添加後すぐに2xのPBS(-)を300 μ L添加し、PBS(-)で2回洗浄した。調製された各細胞は1%ヒト血清入り、0.1%NaN₃、2%FCS含有PBSのStaining Buffer(SB)に2x10⁶/mLの濃度で浮遊させた。細胞浮遊液(100 μ L/ウェル)を96-well丸底プレート(ベクトンディッキンソン社製)に分注した。実施例13で作製された各々のAlexa標識抗体を5 μ g/mLの濃度で氷温下30分間インキュベートした。SBで2回洗浄した後、300 μ LのFACS緩衝液に懸濁し、FACS(FACSscan、ベクトンディッキンソン社製)で各抗体の反応性を調べた。その結果、いずれの抗体もヒト末梢血細胞に結合したが、マウス末梢血細胞に反応しなかった。一方、b-76-8及び9-16-1は、ヒト末梢血細胞だけでなくアカゲザルの末梢血細胞にも同様に結合できた。

(実施例15)BST2インターナリゼーション誘導活性評価

抗体による抗原インターナリゼーション誘導活性は、Andrzej^ら(J. Immunol. 2000 Vol 165:6037)の方法に従い以下の方法にて行った。2x10⁶/mLの濃度でRPMI 8226株を氷冷10%牛胎児血清(FCS)、1%ウサギ血清含有RPMI培地に浮遊させ、細胞浮遊液(100 μ L/ウェル)を96-well丸底プレート(ベクトンディッキンソン社製)に分注した。実施例13で作製されたAlexa FluorTM 488標識抗BST2抗体を氷冷10% FCS含有RPMI培地(GIBCOBRL社製)で700ng/mLの濃度に調製し、各ウェルに100 μ L分注後、氷上で30分間反応させた。氷冷10% FCS含有RPMI培地で4回洗浄することにより、結合されていないAlexa FluorTM 488標識抗BST2抗体を細胞から除去した。37[°]に温めた10% FCS含有RPMI培地に再懸濁後37[°]で培養し、培養0, 15, 30, 60, 120分間後にインターナリゼーションを停止させるために氷冷SBで2回洗浄した。細胞表面上のhBST2と結合している抗体を検出するため、0.0125mg/mLのRPE蛍光標識ウサギ抗ヒトIgG1抗体(DAKO社製)30 μ Lを加え、氷温化30分間インキュベートした。SBで2回洗浄した後、300 μ LのFACS緩衝液に懸濁し、FACSscan(ベクトンディッキンソン社製)で各細胞の平均蛍光強度を測定した。バックグラウンドレベルの設定は、コントロールとしてAlexa FluorTM 488標識IgG1抗体とRPMI 8226株を用いて前述の処理を行った試料の37[°]培養開始時の平均蛍光強度を、Alexaでは3~5、RPEでは6~8を示すように感度を設定することにより行った。その結果を図2に示す。Alexa FluorTM 488の平均蛍光強度は37[°]で培養しても低下することは無かったが、細胞表面上のBST2/抗BST2抗体免疫複合体の存在量を示すRPE蛍光物質の平均蛍光強度は、37[°]の培養時間の経過と共に低下し、培養15分でRPE蛍光物質の平均蛍光強度は、50%以下に低下し、抗BST2抗体(7-90G)は、効率良くBST2のインターナリゼーションを誘導する抗体であった。また、蛍光検鏡法によりインターナリゼーションの様子を観察した(図3)。インターナリゼーション開始15分後には、キャッピング形成が観察され、RPE蛍光物質は細胞表面

染色のみ観察されたが、Alexa FluorTM 488 蛍光物質は、細胞表面上だけでなく、膜に隣接した領域内にインターナライズされた状態でも見られ、また、膜内周囲に散在した細かい点が、ゴルジ装置であると考えられる位置の顆粒群にも存在した。さらに以上の特徴は、抗体が治療用薬剤等で標識されてもBST2を細胞内にインターナライズする能力を損なうことなく、治療用薬剤を細胞内に効率良く暴露できる可能性が高いことを強く示唆する。他の抗BST2抗体も同様な活性が観察された。

(実施例16) チオール基導入メイタンシンの作製

本実施例におけるメイタンシンへのチオール基導入は、Chaririらの方法(Cancer Res., 1992 Vol 52: 127)やU.S. Patent 5,208,020に記載されるような方法を参考にし行った。

10

すなわち20mgのansamitocin P-3(和光純薬工業社製)を4mlのTHFに溶解し、-23℃に冷却しつつ33mg水素化リチウムアルミニウム(10当量)にて5時間還元した。反応液を20mlの10mMリン酸バッファー(pH6.5)に溶解後、当量の酢酸エチルで2度抽出した。酢酸エチル層を濃縮乾固後、シリカゲルカラム(CH₂Cl₂:MeOH=20:1)で精製し、11.8mgのメイタンシノールを調製した。

参考文献に従い別法にて調製された26mgのN-メチル-N-(メチルジチオプロパノイル)-L-アラニン(2当量)、1M塩化亜鉛20μl(1当量)を添加して室温で30分撹拌した。しかし、この条件では反応が進まなかったため、1M塩化亜鉛の添加量を100μl(5当量)に変え室温で30分撹拌した。ここに11.8mgのメイタンシノールを1mlのCH₂Cl₂に溶解して添加し、エステル化反応を行った。3時間後反応液を濃縮乾固し、主生成物を分取TLC(CH₂Cl₂:MeOH=10:1)、続いて分取HPLC(ODSカラム、展開溶媒60% CH₃CN)を用いて精製した。結果、2.5mgのメイタンシン誘導体(May-SS-Me体)を得た。得られたMay-SS-Me体の500MHz¹H-NMRを図6に示す。実施例19に記載されているヒト骨髄腫細胞株IM9の細胞障害活性試験で、得られたMay-SS-Me体のIC₅₀は10nMであり、ansamitocin P-3の1000分の1以下の活性であった。

20

得られたMay-SS-Me体2.5mgを0.46mlエタノール+0.32ml 0.1Mリン酸バッファー(pH7.5, 1mM EDTA含有)溶液に溶解後、ここに100mMのジチオスレイトール80μl(1.5当量)を加え、窒素ガス存在下4で4時間還元した。この結果得られた還元化合物(May-SH)は、60%アセトニトリルで平衡化したODSカラムで精製した(最終収量2.0mg)。

30

(実施例17) 抗BST2抗体(b-76-8)のPDP化

本実施例における抗体へのチオール基の導入は、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジンジチオ)プロピオネート(SPDP、PIERCE社製)を用い、Chaririらの方法(Cancer Res., 1992 Vol 52: 127)と新生化学実験講座・分子免疫学III(日本生化学会編、東京化学同人発行 1992)に記載されるような方法を参考にし調製した。精製抗体b-76-8を、0.1M NaClを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)にて2.6mg/mLの濃度に調製した。2.6mg/mLの抗体溶液5mLに11.5mMのSPDP-エタノール液を42.3μL滴下し、23℃で40分間反応させた。反応液を2mM EDTA含有0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)で平衡化したSephadexTM G-25カラム(NAP25TM、Amersham Pharmacia Biotech社製)にかけ、未反応のSPDPを除去した。得られたサンプルの一部へ1mMになるようにジチオスレイトールを加え、室温5分間反応させた。反応後、遊離したピリジン-2-チオンの343nmの吸光度を測定し、反応系に存在していたPDP基のモル濃度を定量した(ピリジン-2-チオンのε=8.08×10³)。その結果、導入されたPDP基は3.4分子/抗体であった。

40

50

(実施例18) メイタンシン結合 b - 76 - 8 抗体の調製

実施例16で作製された May - SH (170 μ g / 800 μ L) と実施例17で作製された PDP 化 b - 76 - 8 (10 mg / 9 mL) を 4 で 40 時間反応させた。反応液をリン酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化した Sephadex^{T M} G - 25 カラムにかけ、未反応の May - SH を除去した。得られたサンプルの一部へ 1 mM になるようにジチオトレイトールを加え、室温 5 分間反応させた。反応後、遊離したピリジン - 2 - チオンの 343 nm の吸光度を測定し、反応系に存在していた PDP 基のモル濃度を定量した。その結果、導入されたメイタンシン化合物は 1.8 分子 / 抗体であった。0.1 M になるようにシステインを添加し、反応液をリン酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化した Sephadex G - 25 カラムにかけメイタンシン結合 b - 76 - 8 抗体 (May - b - 76 - 8) を精製した。 10

(実施例19) メイタンシン結合 b - 76 - 8 抗体の抗腫瘍活性

実施例11と同法にてヒト骨髄腫細胞株 IM9 細胞 (ATCC CCL - 159) に対する反応性を調べた。その結果、May - b - 76 - 8 抗体は、b - 76 - 8 抗体と同等の反応性を示した。May - b - 76 - 8 抗体の抗腫瘍活性は、次のように行った。96 ウエル平底プレート (ベクtonディッキンソン社製) の各ウエルに 2×10^5 個 / mL の IM9 細胞を 100 μ l と、b - 76 - 8 抗体、May - b - 76 - 8 抗体、あるいはコントロールヒト IgG1 を加え、炭酸ガス培養器内で 24 時間培養した。その後、MTS (3 - (4, 5 - dimethylthiazol - 2 - yl) - 5 - (3 carboxymethoxyphenyl) - 2 - (4 - sulphophenyl) - 2 H - tetrazolium, プロメガ社製) 溶液を 20 μ l 各ウエルに添加し、さらに 2 時間培養した。次いで、生存している細胞を波長 490 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (MTP - 300, コロナ電気社製) で測定した。その結果、IM9 細胞に対しコントロールヒト IgG1 と b - 76 - 8 抗体を添加した場合、有意な細胞障害活性は観察されなかったが、May - b - 76 - 8 抗体は濃度依存的な細胞障害活性が観察され、IC₅₀ は 10 nM (メイタンシン濃度) / 5.5 nM (抗体濃度) であった。 20

(実施例20) メイタンシン結合 b - 76 - 8 抗体のヒト骨髄腫マウスモデルに対する抗腫瘍効果

投与抗体は、濾過滅菌した PBS (-) を用いて 800 μ g / mL に調製し、投与抗体とした。 30

ヒト骨髄腫移植マウスは、SCID マウス (日本クレア) を用いてヒト骨髄腫細胞株 IM9 細胞を、PBS (-) で 2.5×10^7 個 / mL になるように調製した。前日に抗アシア口 GM1 (和光純薬社製) 100 μ l を尾静脈内投与した SCID マウス (メス、6 週令) (日本クレア) に上記 IM9 細胞液 200 μ l を尾静脈より注入した。これらマウスに対し、IM9 細胞移植後 6 日目から 10 日目の間に調製した抗体をそれぞれ 200 μ l 静脈内連日投与した。

May - b - 76 - 8 抗体の抗腫瘍効果については、マウスの生存期間で評価した。その結果、図7に示すように PBS (-) コントロール投与群とアイソタイプコントロールヒト IgG1 投与群では、IM9 細胞移植後 20 日目あたりから死亡が観察され、PBS (-) 投与群では移植後 22 日目に前例死亡し、アイソタイプコントロールヒト IgG1 投与群でも同様な生存期間が観察された。b - 76 - 8 抗体投与群ではコントロール群と比較して、生存期間の延長が認められた (p 0.01, Logrank test)。さらに、b - 76 - 9 - 8 抗体投与群と比較して May - b - 76 - 8 抗体投与群では、有意な生存期間の延長が観察された (p 0.05)。一方、b - 76 - 8 抗体と May - SH (1.9 nmol / shot) を同時に投与しても b - 76 - 8 投与群と比較して有意な生存期間の延長は観察されなかった (p 0.1)。以上の結果より、May - b - 76 - 8 抗体がヒト骨髄腫移植マウスに対して抗腫瘍効果を有すること、さらに本抗体の抗腫瘍効果は b - 76 - 9 - 8 抗体単独投与よりも強いことが示された。この事実はインターナリゼーションを有する抗 Bst 2 抗体にメイタンシンノイド化合物等の抗腫瘍活性のある物質を結合させることによりさらに強い抗腫瘍効果が期待できることを示し、画期 40 50

的な骨髄腫治療薬になることができる。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願2000-403245号の明細書及び/又は図面に記載される内容を包含する。本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願は、そのまま参考として本明細書に取り入れるものとする。

配列表フリーテキスト

配列番号3 - 人工配列の説明：プライマー

配列番号4 - 人工配列の説明：プライマー

配列番号5 - 人工配列の説明：プライマー

配列番号6 - 人工配列の説明：プライマー

配列番号7 - 人工配列の説明：プライマー

配列番号8 - 人工配列の説明：プライマー

配列番号9 - 人工配列の説明：プライマー

産業上の利用可能性

本発明のモノクローナル抗体は、細胞表面のヒトBST2抗原に結合し、インターナリゼーションによって該細胞内部へ局在化しうる特徴を有しているため、この抗体に結合させた治療上有用な薬剤を、BST2を細胞表面に発現する多発性骨髄腫細胞、リンパ球系腫瘍細胞、原発性局所癌細胞などの細胞内に効率よく送達することが可能になり、治療困難な疾患の治療に対し、新しい作用機序に基づく治療剤を提供する利点を有する。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA

<120> New Monoclonal Antibody

10

<130> PH-1481PCT

<150> JP2000-403245

<151> 2000-12-28

<160> 9

20

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 552

<212> DNA

<213> Homo sapiens

30

<400> 1

gtggaattca tggcatctac ttcgtatgac tattgcagag tgcccatgga agacggggat 60
aagcgtgta agcttctgct ggggatagga attctggtgc tctgacat cgtgattctg 120
ggggtgccct tgattatctt caccatcaag gccaacagcg aggcctgccg ggacggcctt 180
cgggcagtga tggagtgtcg caatgtcacc catctcctgc aacaagagct gaccgaggcc 240
cagaagggtt ttcaggatgt ggaggcccag gccgccacct gcaaccacac tgtgatggcc 300
ctaattggctt ccctggatgc agagaaggcc caaggacaaa agaaagtgga ggagcttgag 360

40

ggagagatca ctacattaaa ccataagctt caggacgcgt ctgcagaggt ggagcgactg 420
 agaagagaaa accaggtcctt aagcgtgaga atcgcggaaca agaagtacta cccagctcc 480
 caggactcca gctccgctgc ggcgccccag ctgctgattg igctgctggg cctcagcgt 540
 ctgctgcagt ga 552

<210> 2

<211> 180

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys Arg Val Pro Met Glu Asp Gly

1 5 10 15

20

Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu

20 25 30

Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala

35 40 45

30

Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg

50 55 60

Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly

65 70 75 80

40

Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met

85 90 95

Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys
 100 105 110

Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln
 115 120 125

Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu
 130 135 140

10

Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser
 145 150 155 160

Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser
 165 170 175

20

Ala Leu Leu Gln
 180

30

<210> 3

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 3

aaggaaaaaa gcggccgcgt ggaattcatg gcatctac

38

<210> 4

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

10

<400> 4

ctagtctaga tcatcactgc agcagagcgc tgagg

35

<210> 5

<211> 105

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

30

<400> 5

agatctatga aattcttagt caacgttgcc cttgttttta tggtcgtata catttcttac 60

atctatgcgg atcgagacta caaggatgac gatgacaagg gatcc

105

<210> 6

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 6

cgaggatccc atatgcgga cggccttcgg gc

32

<210> 7

10

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

20

<400> 7

aaggaaaaaa gcgccgctc actgcagcag agcgctgagg

40

<210> 8

<211> 67

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

40

<400> 8

aaggaaaaaa gcgccgccc tggaagttct gttccagggg cccatgtccc ctatactagg 60
ttattgg 67

<210> 9

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

10

<400> 9

cggggtacct caatccgatt ttggaggatg gtcgcc

36

【図面の簡単な説明】

図1は、抗ヒトBST2抗体のRPMI8226細胞株に対する反応性を示す図である。

図2は、抗ヒトBST2抗体(7-90G)のインターナリゼーション誘導活性を示す図である。

20

図3は、37℃培養15分後のRPMI8226細胞内に内在化する抗BST2抗体を示す顕微鏡写真である。

図4は、完全長ヒトBST2DNAの塩基配列を示す図である。

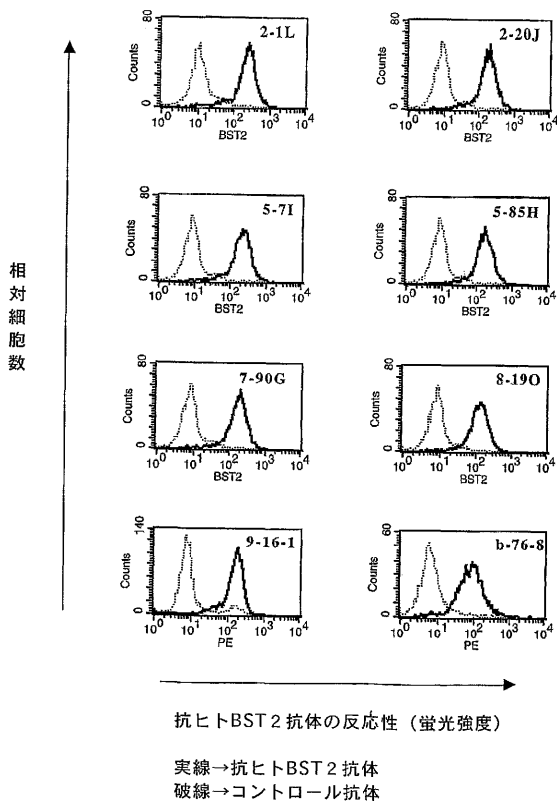
図5は、完全長ヒトBST2のアミノ酸配列を示す図である。

図6は、合成したメイタンシン化合物の500MHz ¹H NMRを示す図である。

図7は、メイタンシン結合b-76-8抗体のヒト骨髄腫マウスモデルに対する抗腫瘍効果を示す図である。

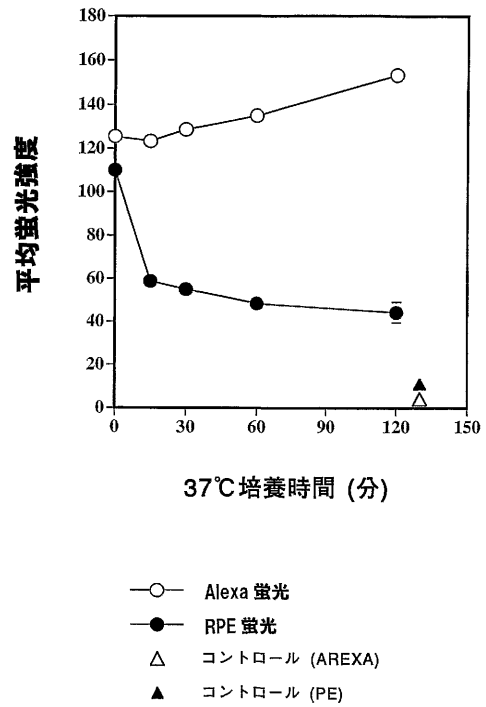
【 図 1 】

図 1



【 図 2 】

図 2



【 図 3 】

図 3



【 図 4 】

図 4

配列番号 1

```

5'-GTGGAATTCATGGCATCTACTTCGTATGACTATTGCAGACTGCCCATGGAAAGCGGGATAAGCGCTGT
AAGCTTCTGCTGGGGATAGGAATTCGTGTGCTCCTGATCATCGTGATTCTGGGGGTGCCCTTGATTATCTTC
ACCATCAAGGCCAACAGCGAGGCTGCCGGGACGGCTTGGGCACTGATGGAGTGTCCGAATGTCACCCAT
CTCCTGCAACAAGAGCTGACCGAGGCCAGAAAGGCTTTCAGGATGTGGAGGCCAGCGCCACCTGCAAC
CACACTGTGATGGCCCTAATGGCTTCCCTGATGCAGAGAAGGCCAAGGACAAAAGAAAGTGGAGAGCTT
GAGGGAGAGATCACTACATTAACCATAAGCTTCAGGACGGCTCTGCAGAGGTGGAGGCACTGAGAAGAGAA
AACCAGTCTTAAGCGTGAGAAATCGCGGACAAGAAGTACTACCCAGCTCCAGGACTCCAGCTCCGCTGG
GCGCCCCAGCTGCTGATTGTGCTGTGGCCCTCAGCGCTCTGCTGCACTGA-3'

```

【 図 5 】

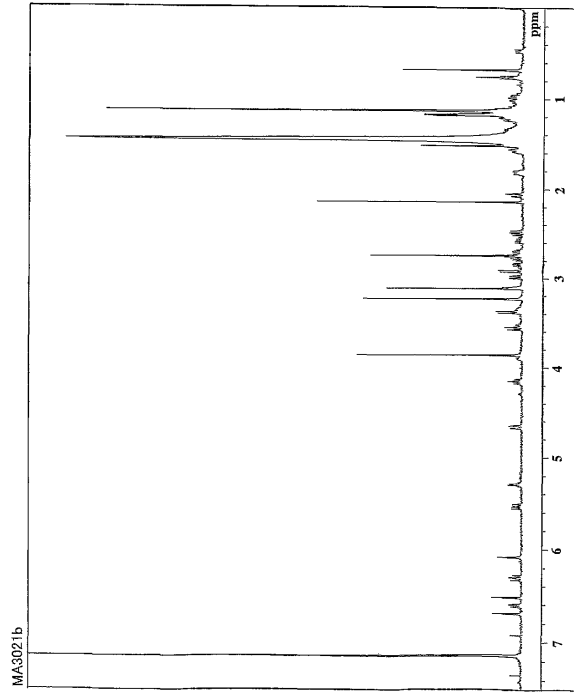
図 5

配列番号 2

10	20	30	40	50	60
MASTSYDYCR VPMEDGDKRC KLLLGIGILV LLIIIVILGVP LIIFTIKANS EACRDGLRAV					
70	80	90	100	110	120
MECRNVTHLL QQELTEAQKG FQDVEAQAAT CNHTVMALMA SLDAEKAQGG KKVEELEGFI					
130	140	150	160	170	180
TTLNHLQDA SAEVERLRRE NQVLSVRIAD KKYYPSSQDS.SSAAAPQLLI VLLGLSALLQ					

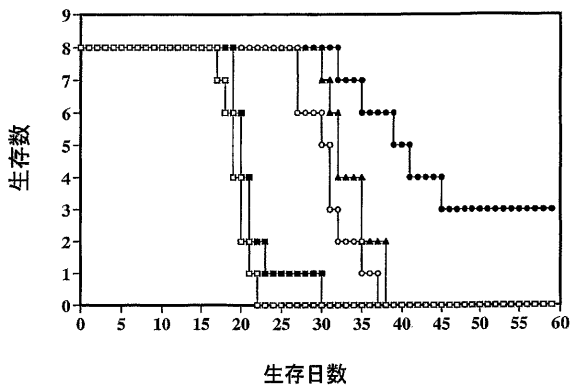
【 図 6 】

図 6



【 図 7 】

図 7



- PBS
- コントロール IgG1
- b-76-8
- ▲— b-76-8 + May-5H
- May-b-76-8

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP01/11493
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C07K16/28, C12P21/08, C12N15/00, A61K47/48, A61K31/5365, A61K39/395L, A61P35/00, A61P35/02, A61P29/00 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) Int.Cl ⁷ C07K16/28, C12N15/00-15/28 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 practicable, search terms used) SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Keiji OZAKI et al., Localization and imaging of Human Plasmacytoma Xenografts in Severe Combined Immunodeficiency Mice by a New Murine Monoclonal Antibody Anti-HM1.24. Tsukushima Journal of Experimental Medicine, 1996, Vol.43, No.1-2, Pages 7 to 15	1-18
X	WO, 99/43703, A1 (Chugai Seiyaku K.K.), 02 September, 1999 (02.09.1999), (Family: none)	1-11
A	JP, 11-92399, A (Chugai Deiyaku K.K.), 06 April, 1999 (06.04.99), (Family: none)	1-18
A	WO, 98/37913, A1 (Chugai Seiyaku K.K.), 03 September, 1998 (03.09.98), & JP 10-298106 A	1-18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family 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 "I" 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 28 February, 2002 (28.02.02)		Date of mailing of the international search report 12 March, 2002 (12.02.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP01/11493
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. C07K16/28, C12P21/08, C12N15/00, A61K47/48, A61K31/5365, A61K39/395L, A61P35/00, A61P35/02, A61P29/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. C07K 16/28, C12N 15/00-15/28		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使った電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Keiji OZAKI et al., LOCALIZATION AND IMAGING OF HUMAN PLASMACYTOMA XENOGRAFTS IN SEVERE COMBINED IMMUNODEFICIENCY MICE BY A NEW MURINE MONOCLONAL ANTIBODY, ANTI-HM1.24. Tokushima Journal of Experimental Medicine, 1996, Vol.43, No.1-2, P.7-15	1-18
X	WO 99/43703 A1 (CHUGAI SEIYAKU KK) 1999.09.02 (ファミリーなし)	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリ 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの 「B」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
国際調査を完了した日 28.02.02		国際調査報告の発送日 12.03.02
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JIP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 鈴木 恵理子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP01/11493
C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 11-92399 A (中外製薬株式会社) 1999.04.06 (ファミリーなし)	1-18
A	WO 98/37913 A1 (CHUGAI SEIYAKU KK) 1998.09.03 &JP 10-298106 A	1-18

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

C 0 7 K 16/30

C 1 2 P 21/08

F I

C 0 7 K 16/30 Z N A

C 1 2 P 21/08

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。