明　細　書

発明の名称 ： 中皮腫の治療方法

技術分野

[0001] 本発明は、ガングリオシドＧＭ２抗原に結合する抗体を用いた治療方法および診断方法、並びにガングリオシドＧＭ２抗原に結合する抗体を有効成分として含有する治療剤および診断剤に関する。

背景技術

[0002] ガングリオシドは、細胞外のシアル酸を含む糖鎖部分と脂質二重層中のセラミドからなる糖脂質の一種であり、その発現は、細胞の種類、器官および動物種により様々である（非特許文献１）。ガングリオシドは、細胞間認識、細胞外基質との相互作用を介して細胞増殖、分化の制御などの様々な生物学的機能を有していることが明らかになっている（非特許文献２，３）。

[0003] また、ガングリオシドは、シアル酸の結合型、結合数、並びに非還元末端に結合するＮ－アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）およびガラクトース（Ｇａｌ）の結合の有無により分類される。ＧＭ２は、ＧａｌＮＡｃβ１－４（ＳＡα２－３）ＧａｌΒ１－４ＧｌｃΒ１－１　Ｃｅｒａｍｉｄｅの糖鎖構造を有するガングリオシドの１つである。

[0004] 更に、ガングリオシドの発現は、細胞の癌化に伴い、量的かつ質的に変化することが報告されており（非特許文献４）、ＧＭ２は、正常細胞でほとんど発現が認められず、肺癌、神経芽腫、神経膠腫などの腫瘍での高発現が知られている（非特許文献４，５）。そのため、ＧＭ２は癌の治療抗体の魅力的な標的抗原と考えられている。

[0005] 中皮腫（ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｏｍａ）は、被覆細胞腫または漿膜細胞腫（ｍｅｓｏｔｈｅｌｉａｌ　ｔｕｍｏｒ）とも呼ばれ、中胚葉を起源とする中皮（胸膜、腹膜、心嚢など）から発生する腫瘍であり、限局性の良性腫瘍とび漫性悪性腫瘍とに分類される。このうち胸膜に発生し悪性であるものが、悪性胸膜中皮腫（ｐｌｕｒａｌ　ｍａｌｉｇｎａｎｔ　ｍｅｓｏｔｈｅｌｉ

ｏｍａ；ＭＰＭ、以下ＭＰＭと略記する場合がある）である。

[0006] 悪性胸膜中皮腫は胸腔に存在する中皮細胞から発生する癌であり、増殖が速く、胸水が認められることも多い（非特許文献６）。悪性胸膜中皮腫では呼吸困難や息切れ、胸痛といった所見が認められ、患者の生活の質（Ｑｕａｌｉｔｙ ｏｆ Ｌｉｆｅ；ＱＯＬ）の低下をもたらす。悪性胸膜中皮腫を引き起こす原因物質としては、アスベスト、鉄およびｓｉｍｉａｎ ｖｉｒｕｓ ４０（ＳＶ４０）などが知られている（非特許文献７，８）。

[0007] その中でも、アスベストへの曝露は悪性胸膜中皮腫の発症と深く関わっているとされ、アスベスト曝露歴がある人は悪性胸膜中皮腫発症リスクが顕著に高いことが知られている。１９７０年から１９８０年にかけ、日本には大量のアスベストが輸入され、使用されてきた（非特許文献９）。アスベストの曝露から悪性胸膜中皮腫発生までの潜伏期間は３０から４０年と考えられていることから、２０１０年から２０２０年にかけて、日本での悪性胸膜中皮腫の罹患率は急激に増えることが予想されている。

[0008] 悪性胸膜中皮腫の唯一の治療法は発症初期の癌の切除であるが、臨床現場では進行した段階で発見されることが多い。さらに、悪性胸膜中皮腫は通常の化学療法や放射線療法が効かず、発病からの平均生存期間は約１年と予後は非常に悪い。そのため、本疾患の予後を改善させる治療方法が求められている。

先行技術文献

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Ｊ．Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ．，１０，６１３（１９６３）

非特許文献2：Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，３，６４６（１９９１）

非特許文献3：Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．，１９２，２１４（１９９３）

非特許文献4：Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，４５，２４０５（１９８５）

非特許文献5：Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，５０，７４４４（１９９０）

非特許文献6：Ｃａｎｃｅｒ　Ｓｃｉ．，９７，１８３（２００６）

非特許文献7：Ｃｅｌｌ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１７，６５７（１９９７）

非特許文献8：Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｃｒｉｔ．Ｃａｒｅ　Ｍｅｄ．，１５３，７１１（１９９６）

非特許文献9：Ｉｎｄｕｓｔｒｉａｌ　Ｈｅａｌｔｈ，３９，６５（２００１）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 中皮腫の治療法は発症初期の癌の切除であるが、臨床現場では進行した段階で発見されることが多い。さらに、中皮腫は通常の化学療法および放射線療法の有効性が低く、予後を改善させる治療方法、治療剤および診断方法が求められている。

[0011] したがって、本発明は、中皮腫の診断および治療に有効であり、中皮腫患者の予後を改善することができる治療法、治療剤および診断方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明は、以下の（１）～（１３）に関する。

（１）ガングリオシドＧＭ２に結合する抗体又は該抗体断片を有効成分として含有する、中皮腫の治療剤または診断剤。

（２）前記中皮腫が、胸膜中皮腫、腹膜中皮腫および心膜中皮腫から選ばれるいずれか１つの中皮腫である、（１）に記載の治療剤または診断剤。

（３）前記胸膜中皮腫または腹膜中皮腫が、悪性胸膜中皮腫または悪性腹膜中皮腫である、（２）に記載の治療剤または診断剤。

（４）前記抗体が、ＧＭ２のα２－３結合したシアル酸（ＳＡ）に結合する抗体である、（１）～（３）のいずれか１項に記載の治療剤または診断剤。

（５）前記抗体が、モノクローナル抗体である、（１）～（４）のいずれか１項に記載の治療剤または診断剤。

（６）前記抗体が、遺伝子組換え抗体である、（１）～（５）のいずれか１

項に記載の治療剤または診断剤。

（７）前記遺伝子組換え抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体から選ばれるいずれか１つの抗体である、（６）に記載の治療剤または診断剤。

（８）前記抗体が、配列番号１～３のそれぞれに表されるアミノ酸配列を含む重鎖（以下、Ｈ鎖）の相補性決定領域（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ　ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ　ｒｅｇｉｏｎ；ＣＤＲ、以下ＣＤＲと略記する）１～３および配列番号４～６のそれぞれに表されるアミノ酸配列を含む軽鎖（以下、Ｌ鎖）ＣＤＲ１～３を含む抗体である、（１）～（７）のいずれか１項に記載の治療剤または診断剤。

（９）前記抗体が、配列番号７で表されるアミノ酸配列を含むＨ鎖可変領域（以下、ＶＨと記す）および配列番号８で表されるアミノ酸配列を含むＬ鎖可変領域（以下、ＶＬと記す）からなる抗体、配列番号７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨおよび配列番号９で表されるアミノ酸配列を含むＶＬからなる抗体、配列番号１０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨおよび配列番号８で表されるアミノ酸配列を含むＶＬからなる抗体、並びに配列番号１０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨおよび配列番号１１で表されるアミノ酸配列を含むＶＬからなる抗体から選ばれるいずれか１つの抗体である、（１）～（８）のいずれか１項に記載の治療剤または診断剤。

（１０）少なくとも１つの併用剤を含む、（１）～（９）のいずれか１項に記載の治療剤または診断剤。

（１１）前記併用剤が化学療法剤およびタンパク医薬から選ばれる少なくとも１つである、（１０）に記載の治療剤または診断剤。

（１２）ガングリオシドＧＭ２に結合する抗体又は該抗体断片を有効成分として用いる、中皮腫の治療方法または診断方法。

（１３）中皮腫の治療剤を製造するための、ガングリオシドＧＭ２に結合する抗体又は該抗体断片の使用。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、抗ガングリオシドＧＭ２抗体を有効成分として含む診断剤および治療剤により、ＧＭ２陽性の中皮腫患者の診断および治療を行い、中皮腫患者の予後を改善することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図１は、悪性中皮腫細胞株のＧＭ２発現をフローサイトメトリーで解析したヒストグラムの結果を示す。横軸はＧＭ２発現量、縦軸は細胞数を表す。また、黒線および灰色ヒストグラムは、それぞれ抗ＧＭ２抗体および陰性対照抗体を反応させた時のヒストグラムである。

[図2]図２（ａ）および（ｂ）は、悪性中皮腫細胞株ＭＳＴＯ－２１１Ｈに対する抗ＧＭ２抗体のＡＤＣＣ活性を評価した結果を示す。縦軸は細胞傷害活性（％）、横軸は抗体濃度（μｇ／ｍＬ）を示す。●は抗ＧＭ２抗体を作用させた場合、○は陰性対照抗体（抗ＤＮＰ抗体）を作用させた場合を示す。ＰＢＭＣドナーＡ［図２（ａ）］およびドナーＢ［図２（ｂ）］の二人の結果を示す。

[図3]図３は、悪性中皮腫細胞株ＭＳＴＯ－２１１Ｈを用いたＳＣＩＤマウス同所移植モデルにおける抗ＧＭ２抗体の抗腫瘍効果を評価した結果を示す。縦軸は胸部腫瘍の質量（ｍｇ）、横軸は投与した試料の種類を示す。●は個々の個体の胸部腫瘍の質量（ｍｇ）を示しており、横棒は平均値を示している。統計的有意差はダネットの多重比較検定により求めた。

[図4]図４は、ヒト悪性中皮腫組織のドナー情報を示す。左から、サンプルＩＤ、年齢、性別、由来組織（又は発見組織）、病理分類における病型、ＴＮＭ（ｔｕｍｏｒ－ｎｏｄｅ－ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ）分類、ミニマムステージグルーピング、正常組織％、病変部位％、腫瘍組織％、腫瘍／多細胞ストローマ％、腫瘍／低又は無細胞ストローマ％および壊死％を示す。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明は、抗ガングリオシドＧＭ２抗体を有効成分として含む中皮腫の治療剤および診断剤、抗ガングリオシドＧＭ２抗体を中皮腫患者に投与することを含む治療方法、並びに抗ガングリオシドＧＭ２抗体を用いた中皮腫患者

の診断方法に関する。

[0016] 本発明において中皮腫とは、被覆細胞腫および漿膜細胞腫（ｍｅｓｏｔｈｅｌｉａｌ　ｔｕｍｏｒ）とも呼ばれ、中胚葉を起源とする中皮（例えば、胸膜、腹膜および心嚢など）から発生する全ての腫瘍をいう。中皮腫は組織型により、限局性の良性腫瘍と、び漫性悪性腫瘍とに分類されるが、いずれの腫瘍も本発明の中皮腫に包含される。

[0017] 中皮腫のうち胸膜原発の腫瘍を、胸膜中皮腫（ｐｌｅｕｒａｌ　ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｏｍａ）といい、悪性の腫瘍を悪性胸膜中皮腫（ＭＰＭ）という。腹膜原発の場合は、腹膜中皮腫という。

[0018] 本発明においてガングリオシドＧＭ２とは、ＧａｌＮＡｃβ１－４（ＳＡα２－３）ＧａｌβＩ－４ＧＩｃβ１－１　Ｃｅｒａｍｉｄｅの構造を有するグルコシルセラミドであり、単にＧＭ２と記載する場合もある。ＧａｌＮＡｃはＮアセチルグルコサミン、Ｇａｌはガラクトース、ＧＩｃはグルコース、ＳＡはシアル酸を示す。

[0019] 本発明に用いられる抗ＧＭ２抗体としては、ＧａｌＮＡｃβ１－４（ＳＡα２－３）ＧａｌβＩ－４ＧＩｃβ１－１　Ｃｅｒａｍｉｄｅ構造のα２－３結合したシアル酸（ＳＡ）を含むエピトープに結合する抗ＧＭ２抗体、該エピトープに結合してエフェクター活性を有する抗ＧＭ２抗体、および中皮腫患者の胸水産生を抑制する抗体などが挙げられる。

[0020] また、上述の抗体から選ばれるいずれか１つの抗体と競合してＧＭ２に結合する抗体、上述の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体および該抗体断片などが挙げられる。

[0021] 本発明に用いられる抗体として具体的には、日本国特開平４－３１１３８５号公報に記載のマウスモノクローナル抗体ＫＭ７５０、マウスモノクローナル抗体ＫＭ７９６、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，４６，４１１６（１９８６）に記載のモノクローナル抗体ＭｏＡｂ５－３、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，４８，６１５４（１９８８）に記載のモノクローナル抗体ＭＫ１－１６、モノクローナル抗体ＭＫ２－３４、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６４，１２

１２２（１９８９）に記載のモノクローナル抗体ＤＭＡｂ－１、国際公開第２００３／０４９７０４号および国際公開第０４／５３１０２号に記載のキメラ抗体ＤＭＦ　１０．１６７．４抗体およびキメラ抗体ＣｈＧＭ２、日本国特開平１０－２５７８９３号公報に記載の形質転換株ＫＭ８９６６（ＦＥＲＭ　ＢＰ－５１０５）が生産するＫＭ８９６６、形質転換株ＫＭ８９６７（ＦＥＲＭ　ＢＰ－５１０６）が生産するＫＭ８９６７、形質転換株ＫＭ８９６９（ＦＥＲＭ　ＢＰ－５５２７）が生産するＫＭ８９６９および形質転換株ＫＭ８９７０（ＦＥＲＭ　ＢＰ－５５２８）が生産するＫＭ８９７０、配列番号１～３のそれぞれに表されるアミノ酸配列を含むＨ鎖ＣＤＲ１～３および配列番号４～６のそれぞれに表されるアミノ酸配列を含むＬ鎖ＣＤＲ１～３を含む抗体、配列番号７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨおよび配列番号８で表されるアミノ酸配列を含むＶＬからなる抗体、配列番号７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨおよび配列番号９で表されるアミノ酸配列を含むＶＬからなる抗体、配列番号１０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨおよび配列番号８で表されるアミノ酸配列を含むＶＬからなる抗体、並びに配列番号１０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨおよび配列番号１１で表されるアミノ酸配列を含むＶＬからなる抗体、から選ばれるいずれか１つの抗体が挙げられる。

[0022] また、上述の抗体と競合してＧＭ２に結合する抗体、および上述の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体も本発明に用いることができる。

[0023] 本発明に用いられる抗ＧＭ２抗体としては、モノクローナル抗体、オリゴクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれであってもよいが、好ましくは単一のエピトープに結合するモノクローナル抗体が挙げられる。

[0024] 本発明に用いられるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマから生産されるモノクローナル抗体であってもよいし、遺伝子組換え技術によって作製された遺伝子組換え抗体であってもいずれの抗体でもよい。ヒトにおいて免疫原性を低下させるために、ヒト型キメラ抗体（以下、単にキメラ抗体ともい

う）、ヒト化抗体［ヒト型ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ　ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ　ｒｅｇｉｏｎ；（ＣＤＲ）移植抗体ともいう］および遺伝子組換え技術を用いたヒト抗体を用いることが好ましい。

[0025] 本発明に用いられる抗体としては、上述に挙げた抗体のうち、ヒト化抗体およびヒト抗体が好適に用いられる。

[0026] キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体のＶＨおよびＶＬと、ヒト抗体の重鎖定常領域（以下、ＣＨと略記する）および軽鎖定常領域（以下、ＣＬと略記する）とからなる抗体である。可変領域についての動物の種類は、マウス、ラット、ハムスターまたはウサギなどのハイブリドーマを作製しうる動物であれば特に限定されない。

[0027] ヒト型キメラ抗体は、ＧＭ２に特異的に結合するヒト以外の動物の抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを取得し、ヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードする遺伝子を有する発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入して発現させることで作製できる。ヒト型キメラ抗体のＣＨは、ヒトイムノグロブリン（以下、ｈＩｇと略記する）であれば特に限定されないが、ｈＩｇＧクラスのものが好ましい。ヒト型キメラ抗体のＣＬは、ｈＩｇＧに属すれば特に限定されない。

[0028] ヒト化抗体は、ヒト以外の動物の抗体のＶＨおよびＶＬの相補性決定領域（以下、ＣＤＲと略記する）をヒト抗体のＶＨおよびＶＬの適切な位置に移植した抗体である。ヒト型ＣＤＲ移植抗体は、ＧＭ２に特異的に結合するヒト以外の動物の抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲを任意のヒト抗体のＶＨおよびＶＬのフレームワーク（以下、ＦＲと略記する）に移植したＶ領域をコードするｃＤＮＡを構築し、ヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードするＤＮＡを有する発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト化抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入して発現させることで、作製されうる。ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列は、ヒト抗体由来のアミノ酸配列であれば特に限定されない。

[0029] ヒト化抗体のＣＨは、ｈＩｇであれば特に限定されないが、ｈＩｇＧクラ

スのものが好ましい。ヒト化抗体のＣＬは、ｈｌｇに属すれば特に限定されない。

[0030] 本発明に用いられるヒト化抗体として具体的には、日本国特開平４－３１１３８５号公報に記載のマウスモノクローナル抗体ＫＭ７５０、マウスモノクローナル抗体ＫＭ７９６、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，４６，４１１６（１９８６）に記載のモノクローナル抗体ＭｏＡｂ５－３、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，４８，６１５４（１９８８）に記載のモノクローナル抗体ＭＫ１－１６、モノクローナル抗体ＭＫ２－３４、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６４，１２１２２（１９８９）に記載のモノクローナル抗体ＤＭＡｂ－１、国際公開第２００３／０４９７０４号および国際公開第０４／５３１０２号に記載のキメラ抗体ＤＭＦ １０．１６７．４抗体およびキメラ抗体ＣｈＧＭ２、並びに日本国特開平１０－２５７８９３号公報に記載の形質転換株ＫＭ８９６６（ＦＥＲＭ ＢＰ－５１０５）が生産するＫＭ８９６６、形質転換株ＫＭ８９６７（ＦＥＲＭ ＢＰ－５１０６）が生産するＫＭ８９６７、形質転換株ＫＭ８９６９（ＦＥＲＭ ＢＰ－５５２７）が生産するＫＭ８９６９および形質転換株ＫＭ８９７０（ＦＥＲＭ ＢＰ－５５２８）が生産するＫＭ８９７０から選ばれる抗ＧＭ２抗体のＣＤＲのアミノ酸配列または、これら抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列を有するヒト化抗体が挙げられる。

[0031] 更に具体的には、配列番号１～３のそれぞれに表されるアミノ酸配列を含むＨ鎖ＣＤＲ１～３および配列番号４～６のそれぞれに表されるアミノ酸配列を含むＬ鎖ＣＤＲ１～３を含むヒト化抗体、配列番号７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨおよび配列番号８で表されるアミノ酸配列を含むＶＬからなるヒト化抗体、配列番号７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨおよび配列番号９で表されるアミノ酸配列を含むＶＬからなるヒト化抗体、配列番号１０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨおよび配列番号８で表されるアミノ酸配列を含むＶＬからなるヒト化抗体、並びに配列番号１０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨおよび配列番号１１で表されるアミノ酸配列を含むＶＬからなるヒト化抗体が挙げられる。

[0032] 本発明の治療剤に含まれる抗ＧＭ２抗体断片としては、上記各抗体断片が含まれる。抗体断片の種類は特に限定されず、例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、ｓｃＦｖ、ｄｉａｂｏｄｙ、ｄｓＦｖおよびＣＤＲを含むペプチドなどが挙げられる。

[0033] Ｆａｂは、ＩｇＧをパパイン（タンパク質分解酵素）で処理して得られる断片のうち、分子量約５万の抗原結合活性を有する抗体断片である。抗ＧＭ２抗体のＦａｂは、抗ＧＭ２抗体をパパインで処理するか、前記抗体のＦａｂをコードするＤＮＡを発現ベクターに挿入し、このベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入して発現させることで、作製されうる。

[0034] Ｆ（ａｂ’）$_2$は、ＩｇＧをペプシン（タンパク質分解酵素）で処理して得られる断片のうち、分子量約１０万の抗原結合活性を有する抗体断片である。抗ＧＭ２抗体のＦ（ａｂ’）$_2$は、抗ＧＭ２抗体をペプシンで処理するか、Ｆａｂ’（後述）をチオエーテル結合またはジスルフィド結合で結合させることで、作製されうる。

[0035] Ｆａｂ’は、Ｆ（ａｂ’）$_2$のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約５万の抗原結合活性を有する抗体断片である。抗ＧＭ２抗体のＦａｂ’は、抗ＧＭ２抗体のＦ（ａｂ’）$_2$をジチオスレイトールで処理するか、前記抗体のＦａｂ’をコードするＤＮＡを発現ベクターに挿入し、このベクターを原核生物または真核生物へ導入して発現させることで、作製されうる。

[0036] ｓｃＦｖは、１本のＶＨと１本のＶＬとを適当なペプチドリンカーを用いて連結した抗原結合活性を有する抗体断片である。抗ＧＭ２抗体のｓｃＦｖは、抗ＧＭ２抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを取得し、ｓｃＦｖをコードするＤＮＡを構築し、このＤＮＡを発現ベクターに挿入し、この発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入して発現させることで、作製されうる。

[0037] ｄｉａｂｏｄｙは、ｓｃＦｖが二量体化した抗体断片で、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。抗ＧＭ２抗体のｄｉａｂｏｄｙは、抗ＧＭ２抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを取得し、ｄｉａｂｏｄｙをコ

ードするＤＮＡを構築し、このＤＮＡを発現ベクターに挿入し、この発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入して発現させることで、作製されうる。

[0038] ｄｓＦｖは、ＶＨおよびＶＬ中のそれぞれ１アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを、システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させた抗体断片である。抗ＧＭ２抗体のｄｓＦｖは、抗ＧＭ２抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを取得し、ｄｓＦｖをコードするＤＮＡを構築し、このＤＮＡを発現ベクターに挿入し、この発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入して発現させることで、作製されうる。

[0039] ＣＤＲを含むペプチドは、ＶＨまたはＶＬのＣＤＲの少なくとも１領域以上を含むペプチドである。抗ＧＭ２抗体のＣＤＲを含むペプチドは、抗ＧＭ２抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲをコードするＤＮＡを構築し、このＤＮＡを発現ベクターに挿入し、この発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入して発現させることで、作製されうる。

[0040] また、抗ＧＭ２抗体のＣＤＲを含むペプチドは、Ｆｍｏｃ法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）またはｔＢｏｃ法（ｔ－ブチルオキシカルボニル法）などの化学合成法によっても作製することができる。

[0041] 本発明において用いられる抗ＧＭ２抗体は、エフェクター活性を有している。本発明においてエフェクター活性とは、抗体のＦｃ領域を介して引き起こされる活性をいい、抗体依存性細胞傷害活性（ＡＤＣＣ活性）、補体依存性傷害活性（ＣＤＣ活性）、およびマクロファージ若しくは樹状細胞などの食細胞による抗体依存性ファゴサイトーシス（Ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｐｈａｇｏｃｙｔｏｓｉｓ，ＡＤＰ活性）などが知られている。

[0042] エフェクター活性を制御する方法としては、例えば、抗体のＦｃ領域のＥＵインデックス（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ、Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ ｉｎｔｅｒｅｓｔｓ，５th ｅｄｉｔｉｏｎ，１９９１）２９７番目のアスパラギン（Ａｓｎ）に

結合するＮ結合複合型糖鎖の還元末端に存在するＮ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）にα１－６結合するフコース（コアフコースともいう）の量を制御する方法（国際公開第２００５／０３５５８６号、国際公開第２００２／３１１４０号、国際公開第００／６１７３９号）、および抗体のＦｃ領域のアミノ酸残基を改変することで制御する方法などが挙げられる。

[0043] 抗体のＦｃに結合しているＮ結合複合型糖鎖のコアフコースの含量を制御することで、抗体のエフェクター活性を増加または低下させることができる。抗体のＦｃに結合しているＮ結合複合型糖鎖に結合するフコースの含量を低下させる方法としては、α１，６－フコース転移酵素遺伝子（ｆｕｃｏｓｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ－８，ＦＵＴ８）が欠損したＣＨＯ細胞を用いて抗体を発現させることで、抗体のＦｃ領域に結合しているＮ結合複合型糖鎖にコアフコースが結合していない抗体（以下、フコースが結合していない抗体と称する）を取得することができる。従って、本発明で用いられる抗ＧＭ２抗体は、コアフコースが低下または結合していないことが好ましい。

[0044] フコースが結合していない抗体は高いＡＤＣＣ活性を有する。一方、抗体のＦｃに結合しているＮ結合複合型糖鎖に結合するフコースの含量を増加させる方法としては、α１，６－フコース転移酵素遺伝子を導入した宿主細胞を用いて抗体を発現させることで、フコースが結合している抗体を取得できる。フコースが結合している抗体は、フコースが結合していない抗体よりも低いＡＤＣＣ活性を有する。

[0045] また、抗体のＦｃ領域のアミノ酸残基を改変することでＡＤＣＣ活性またはＣＤＣ活性を増加または低下させることができる。Ｆｃ領域のアミノ酸残基改変を行うことで、ＦｃγＲへの結合活性を増加させるまたは低下させることによりＡＤＣＣ活性を制御することができるし、Ｆｃ領域のアミノ酸残基改変を行うことで、補体の結合活性を増加させるまたは低下させることによりＣＤＣ活性を制御することができる。

[0046] 例えば、米国出願公開第２００７－０１４８１６５号明細書および米国出願公開第２０１２－００１０３８７号明細書に記載のＦｃ領域またはＣＨの

アミノ酸配列を用いることで、抗体のＣＤＣ活性を増加させることができる。また、米国特許第６，７３７，０５６号明細書、米国特許第７，２９７，７７５号明細書、米国特許第７，３１７，０９１号明細書および国際公開第２００５／０７０９６３号に記載のアミノ酸残基改変を行うことで、ＡＤＣＣ活性またはＣＤＣ活性を、増加させることも低下させることもできる。

[0047] 本発明の治療剤は、中皮腫患者へ投与されると、有効成分として含まれる抗ＧＭ２抗体が中皮腫細胞に発現するＧＭ２に特異的に結合した結果、中皮腫細胞の細胞増殖抑制効果、胸水産生の抑制効果及びｎａｔｕｒａｌ　ｋｉｌｌｅｒ細胞（ＮＫ細胞）を初めとするエフェクター細胞によるＡＤＣＣ活性を誘導する効果等の抗腫瘍効果を発揮することで、中皮腫患者を治療することができる。従って、本発明の治療剤としては、抗ＧＭ２抗体を有効成分として含む中皮腫の治療剤が挙げられる。

[0048] 本発明の中皮腫の治療剤としては、抗ＧＭ２抗体を有効成分として含む治療剤であればいかなるものでもよいが、通常は薬理学的に許容される一つまたはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが好ましい。

[0049] 好ましくは水、または食塩、グリシン、グルコース若しくはヒトアルブミン等の水溶液等の水性担体に溶解した無菌的な溶液が用いられる。また、製剤溶液を生理的条件に近づけるための緩衝化剤または等張化剤のような、薬理学的に許容される添加剤、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化カリウム若しくはクエン酸ナトリウム等を添加することもできる。また、凍結乾燥して貯蔵し、使用時に適当な溶媒に溶解させて用いることもできる。

[0050] 本発明の治療剤の投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが好ましく、例えば、経口投与、並びに口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内、髄腔内および静脈内等の非経口投与を挙げることができる。これらの中でも、髄腔内投与または静脈内投与が好ましい。

[0051] 経口投与に適当な製剤としては、例えば、乳剤、シロップ剤、カプセル剤

、錠剤、散剤および顆粒剤等が挙げられる。例えば、乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール若しくは果糖等の糖類、ポリエチレングリコール若しくはプロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油若しくは大豆油などの油類、ｐ－ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、またはストロベリーフレーバー若しくはペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤または顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖若しくはマンニトール等の賦形剤、デンプン若しくはアルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム若しくはタルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース若しくはゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、またはグリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

[0052] 非経口投与に適当な製剤としては、例えば、注射剤、座剤および噴霧剤等が挙げられる。例えば、注射剤は、塩溶液若しくはブドウ糖溶液、または両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

[0053] また、噴霧剤は該抗体そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

[0054] 本発明の治療剤の投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人１日当たり１μｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇである。

[0055] 本発明の治療剤としては、本発明に使用される抗ＧＭ２抗体と少なくとも１つの併用剤とを含む治療剤も含まれる。

[0056] 併用剤としては、例えば、化学療法剤およびタンパク医薬などが挙げられ

る。

[0057] 化学療法剤としては、例えば、ドキソルビシン、リポソーマルドキソルビン、シスプラチン、カルボプラチン、ビンクリスチン、フルダラビン、ジェムシタビン、ペメトレキセド、サリドマイド、レナリドマイド、ポマリドマイドなどが挙げられる。これらの中でも、シスプラチンまたはペメトレキセドが好ましい。

[0058] また、例えば、血管新生に関るチロシンキナーゼを阻害するＥ７０８０も併用薬として挙げられる。

[0059] タンパク医薬としては、例えば、サイトカイン、抗体などが挙げられる。

[0060] サイトカインとしては、例えば、免疫担当細胞であるＮＫ細胞、マクロファージ、単球および顆粒球などのエフェクター細胞を活性化するサイトカイン、並びに当該サイトカインの誘導体などが挙げられる。

[0061] 具体的なサイトカインとしては、例えば、インターロイキン－２（ＩＬ－２）、インターフェロン（ＩＦＮ）－α、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、フラクタルカイン（ｆｒａｃｔａｌｋｉｎｅ）、ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ－ｃｏｌｏｎｙ ｓｔｉｍｕｌａｔｉｎｇ ｆａｃｔｏｒ（Ｍ－ＣＳＦ）、ＧＭ－ＣＳＦ、Ｇ－ＣＳＦ、ｔｕｍｏｒ ｎｅｃｒｏｓｉｓ ｆａｃｔｏｒ（ＴＮＦ）－α、ＴＮＦ－β、ＩＬ－１αおよびＩＬ－１βなどが挙げられるが、ＩＦＮ－γが好ましい。

[0062] 抗体としては、本発明に用いられるＧＭ２に特異的に結合する遺伝子組換え抗体が標的とする中皮腫に対する治療抗体、血管新生阻害抗体もしくは免疫活性を賦活化させる抗体、またはそれらの抗体断片もしくは融合抗体などが挙げられる。

[0063] 具体的には、例えば、抗ＣＤ４０抗体（例えばＳＧＮ－４０、ＨＣＤ１２２など）、抗ＶＥＧＦ抗体（ｂｅｖａｃｉｚｕｍａｂなど）、抗ＩＬ－６Ｒ抗体（日本国特許６５１５４１号明細書）、抗ＩＬ－６抗体（ＣＮＴＯ３２８）、抗ＣＴＬＡ４抗体（Ｉｐｉｌｉｍｕｍａｂなど）、抗ＣＣＲ４抗体（Ｍｏｇａｍｕｌｉｚｕｍａｂなど）などが挙げられる。

[0064] 本発明の抗体または該抗体断片としては、上述併用可能な薬剤とコンジュゲートした抗体または該抗体断片が挙げられる。

[0065] 本発明の治療剤は、ＧＭ２を発現している中皮腫であれば、中皮腫が発現する組織、良性および悪性を問わず治療に用いることができる。本発明において、抗ＧＭ２抗体を有効成分として含む中皮腫の治療剤と上述の併用剤を同時または別々に投与する併用療法も、本発明に含まれる。

[0066] また、本発明は、抗ＧＭ２抗体を有効成分として投与することを含む中皮腫患者の治療方法も含まれる。本発明の中皮腫患者の治療方法は、抗ＧＭ２抗体を有効成分として中皮腫患者に投与すると同時また別々に、上述した少なくとも１つの併用剤を中皮腫患者へ投与することを含む中皮患者の併用療法も含まれる。併用療法は、抗ＧＭ２抗体と併用剤と、いずれを先又は後に投与してもよく、中皮腫患者の病期、病状に合わせて適宜調製することができる。

[0067] 本発明の中皮腫の治療方法は、抗ＧＭ２抗体がＧＭ２を発現した中皮腫細胞に特異的に結合した結果、中皮腫細胞の細胞増殖抑制および胸水産生抑制をすることができる。また、本発明の中皮腫の治療方法は、抗ＧＭ２抗体がＧＭ２を発現した中皮腫細胞に特異的に結合した結果、患者体内に存在するｎａｔｕｒａｌ　ｋｉｌｌｅｒ細胞（ＮＫ　ｃｅｌｌ）を初めとするエフェクター細胞を介したＡＤＣＣ活性による中皮腫細胞の細胞傷害誘導、中皮腫細胞の細胞増殖抑制、および胸水の産生抑制をすることができる。

[0068] 従って本発明には、抗ＧＭ２抗体を用いた中皮腫細胞の増殖抑制方法、中皮腫細胞の細胞傷害誘導方法および胸水産生の抑制方法も含まれる。

[0069] 本発明の治療方法および治療剤の効果は、動物モデルを用いたｉｎ　ｖｉｖｏ抗腫瘍活性を測定することによって調べることができる。

[0070] 動物モデルとしては、例えば、ヒト癌組織由来の培養細胞株をマウスに移植した異種移植モデルが挙げられる。異種移植モデルはＳＣＩＤマウス等の免疫不全マウスの皮下、皮内、胸腔内、心膜内、腹腔内または静脈内等様々な部位にヒト癌細胞株を移植することにより作製することができる。

[0071] 上記動物モデルを用いて抗体の単独投与の効果、併用剤との併用投与の効果など、本発明の治療剤の効果を評価することができる。

[0072] 本発明は、抗ＧＭ２抗体を用いた中皮腫の診断方法も含まれる。抗ＧＭ２抗体または該抗体断片を用いて、ＧＭ２、ＧＭ２が発現した細胞および／または組織を検出または測定することにより、ＧＭ２が関与している中皮腫患者を診断することができる。

[0073] まず、複数の健常者の生体から採取した生体試料について、抗ＧＭ２抗体または該抗体断片、またはこれらの誘導体を用いて、下記の免疫学的手法を用いて、ＧＭ２の検出または測定を行い、健常者の生体試料中のＧＭ２の存在量を調べる。

[0074] 次に、被験者の生体試料中についても同様にＧＭ２の存在量を調べ、その存在量を健常者の存在量と比較する。被験者のＧＭ２存在量が健常者と比較して増加している場合には、中皮腫であると診断される。

[0075] 免疫学的手法とは、標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体量または抗原量を検出または測定する方法である。例えば、放射性物質標識免疫抗体法、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、発光免疫測定法、ウェスタンブロット法または物理化学的手法などを用いる。

[0076] 放射性物質標識免疫抗体法は、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、抗ＧＭ２抗体または該抗体断片を反応させ、さらに放射性標識を施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する。

[0077] 酵素免疫測定法は、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、抗ＧＭ２抗体または該抗体断片を反応させ、さらに標識を施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する。例えば、サンドイッチＥＬＩＳＡ法などを用いる。

[0078] 酵素免疫測定法で用いる標識体としては、公知［酵素免疫測定法，医学書院（１９８７）］の酵素標識を用いることができる。例えば、アルカリフォスファターゼ標識、ペルオキシダーゼ標識、ルシフェラーゼ標識、またはビ

オチン標識などを用いる。サンドイッチＥＬＩＳＡ法は、固相に抗体を結合させた後、検出または測定対象である抗原をトラップさせ、トラップされた抗原に第２の抗体を反応させる方法である。

[0079] 該ＥＬＩＳＡ法では、検出または測定したい抗原を認識する抗体または抗体断片であって、抗原認識部位の異なる２種類の抗体を準備し、そのうち、第１の抗体または抗体断片を予めプレート（例えば、９６ウェルプレート）に吸着させ、次に第２の抗体または抗体断片をＦＩＴＣなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素、またはビオチンなどで標識しておく。

[0080] 上記の抗体が吸着したプレートに、生体内から分離された、細胞またはその破砕液、組織またはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、または眼液などを反応させた後、標識したモノクローナル抗体または抗体断片を反応させ、標識物質に応じた検出反応を行う。濃度既知の抗原を段階的に希釈して作製した検量線より、被験サンプル中の抗原濃度を算出する。

[0081] ＧＭ２のＥＬＩＳＡとしては以下のような方法が挙げられる。ＧＭ２をフォスファチジルコリンとコレステロールとを含むエタノール溶液に溶解する。この溶液をマイクロタイタープレートの各ウェルにそれぞれ分注し、風乾後ｂｏｖｉｎｅ ｓｅｒｕｍ ａｌｂｕｍｉｎ（ＢＳＡ）を含むｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｂｕｆｆｅｒ ｓａｌｉｎｅ（ＰＢＳ）（以下、ＢＳＡ－ＰＢＳと略記する）でブロッキングする。これにＧＭ２抗体を反応させ、適当な酵素で標識された２次抗体を反応させて、ＧＭ２の存在量を確認することができる。

[0082] サンドイッチＥＬＩＳＡ法に用いる抗体としては、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれを用いてもよく、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、またはＦ（ａｂ）$_2$などの抗体フラグメントを用いてもよい。

[0083] サンドイッチＥＬＩＳＡ法で用いる２種類の抗体の組み合わせとしては、異なるエピトープを認識するモノクローナル抗体または抗体断片の組み合わせでもよいし、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体または抗体断片との組み合わせでもよい。

[0084] 蛍光免疫測定法は、文献［Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ－Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）、単クローン抗体実験マニュアル，講談社サイエンティフィック（１９８７）］などに記載された方法で測定する。蛍光免疫測定法で用いる標識体としては、公知［蛍光抗体法，ソフトサイエンス社（１９８３）］の蛍光標識を用いることができる。例えば、ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ ｉｓｏｔｈｉｏｃｙａｎａｔｅ（ＦＩＴＣ）、ＲＩＴＣ、Ｃｙ３、Ｃｙ５またはＡｌｅｘａなどを用いる。

[0085] 発光免疫測定法は文献［生物発光と化学発光　臨床検査４２，廣川書店（１９９８）］などに記載された方法で測定する。発光免疫測定法で用いる標識体としては、公知の発光体標識があげられ、アクリジニウムエステル、またはロフィンなどを用いる。

[0086] ウェスタンブロット法は、抗原または抗原を発現した細胞などをＳＤＳ（ドデシル硫酸ナトリウム）－ＰＡＧＥ［Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８）］で分画した後、該ゲルをポリフッ化ビニリデン（ＰＶＤＦ）膜またはニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に抗原を認識する抗体または抗体断片を反応させ、さらにＦＩＴＣなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素標識、またはビオチン標識などを施した抗マウスＩｇＧ抗体または結合断片を反応させた後、該標識を可視化することによって測定する。一例を以下に示す。

[0087] ＧＭ２を発現している細胞または組織を溶解し、還元条件下でレーンあたりのタンパク量として０．１～３０μｇをＳＤＳ－ＰＡＧＥ法により泳動する。泳動されたタンパク質をＰＶＤＦ膜にトランスファーし１～１０％　ＢＳＡを含むＰＢＳ（以下、ＢＳＡ－ＰＢＳと表記する）に室温で３０分間反応させブロッキング操作を行う。

[0088] ここで本発明のモノクローナル抗体を反応させ、０．０５～０．１％のＴｗｅｅｎ－２０を含むＰＢＳ（以下、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳと表記する）で洗

浄し、ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗マウスＩｇＧを室温で２時間反応させる。

[0089] Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄し、ＥＣＬ（登録商標） Ｗｅｓｔｅｒｎ Ｂｌｏｔｔｉｎｇ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔｓ（アマシャム社製）などを用いてモノクローナル抗体が結合したバンドを検出することにより、ＧＭ２を検出する。ウェスタンブロッティングでの検出に用いられる抗体としては、ＧＭ２に結合できる抗体が用いられる。

[0090] 物理化学的手法は、例えば、抗原であるＧＭ２と抗ＧＭ２抗体またはその抗体断片とを結合させることにより凝集体を形成させて、この凝集体を検出することにより行う。この他に物理化学的手法として、毛細管法、一次元免疫拡散法、免疫比濁法またはラテックス免疫比濁法［臨床検査法提要，金原出版（１９９８）］などを用いることもできる。

[0091] ラテックス免疫比濁法は、抗体または抗原を感作させた粒径０．１～１μｍ程度のポリスチレンラテックスなどの担体を用い、対応する抗原あるいは抗体により抗原抗体反応を起こさせると、反応液中の散乱光は増加し、透過光は減少する。この変化を吸光度または積分球濁度として検出することにより被験サンプル中の抗原濃度などを測定する。

[0092] 一方、ＧＭ２が発現している細胞の検出または測定は、公知の免疫学的検出法を用いることができるが、好ましくは免疫沈降法、免疫細胞染色法、免疫組織染色法または蛍光抗体染色法などを用いる。

[0093] 免疫沈降法は、ＧＭ２を発現した細胞若しくはＧＭ２を含む組織抽出液など抗ＧＭ２抗体またはその抗体断片と反応させた後、プロテインＧ－セファロースなどのイムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体複合体を沈降させる。または以下のような方法によっても行なうことができる。

[0094] ＥＬＩＳＡ用９６ウェルプレートに上述した本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を固相化した後、ＢＳＡ－ＰＢＳによりブロッキングする。抗体が、例えばハイブリドーマ培養上清などの精製されていない状態で

ある場合には、抗マウスイムノグロブリン、抗ラットイムノグロブリン、プロテイン－Ａまたはプロテイン－Ｇなどをあらかじめ ＥＬＩＳＡ用９６ウェルプレートに固相化し、ＢＳＡ－ＰＢＳでブロッキングした後、ハイブリドーマ培養上清を分注して結合させる。

[0095] 次に、ＢＳＡ－ＰＢＳを捨てＰＢＳでよく洗浄した後、ＧＭ２を発現している細胞または組織の溶解液を反応させる。よく洗浄した後のプレートより免疫沈降物をＳＤＳ－ＰＡＧＥ用サンプルバッファーで抽出し、上記のウェスタンブロッティングにより検出する。

[0096] 免疫細胞染色法または免疫組織染色法は、抗原を発現した細胞または組織などを、場合によっては抗体の通過性を良くするため界面活性剤またはメタノールなどで処理した後、抗ＧＭ２抗体と反応させ、さらにＦＩＴＣなどの蛍光標識、ペルオキシダーゼなどの酵素標識またはビオチン標識などを施した抗イムノグロブリン抗体またはその結合断片と反応させた後、該標識を可視化し、顕微鏡にて顕鏡する方法である。

[0097] また、蛍光標識の抗体と細胞を反応させ、フローサイトメーターにて解析する蛍光抗体染色法［Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ－Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）、単クローン抗体実験マニュアル，講談社サイエンティフィック（１９８７）］により検出を行うことができる。特に、本発明で用いられる抗ＧＭ２抗体またはその抗体断片は、蛍光抗体染色法により細胞膜上に発現しているＧＭ２を検出することができる。

[0098] また、蛍光抗体染色法のうち、ＦＭＡＴ８１００ＨＴＳシステム（アプライドバイオシステム社製）などを用いた場合には、形成された抗体－抗原複合体と、抗体－抗原複合体の形成に関与していない遊離の抗体または抗原とを分離することなく、抗原量または抗体量を測定できる。

実施例

[0099] 以下に、実施例により本発明を説明するが、これに限定されるものではな

い。

[0100] ［実施例１］フローサイトメトリー（ＦＣＭ）を用いた悪性中皮腫細胞株におけるＧＭ２発現の解析

悪性中皮腫細胞株ＮＣＩ－Ｈ２２６（ＣＲＬ－５８２６）、ＭＳＴＯ－２１１Ｈ（ＣＲＬ－２０８１）およびＮＣＩ－Ｈ２４５２（ＣＲＬ－５９４６）をＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）から、悪性中皮腫細胞株ＡＣＣ－ＭＥＳＯ－１（ＲＣＢ－２２９２）を理研セルバンクから入手し、実験に供した（Ｃａｎｃｅｒ Ｓｃｉ ２００６；９７：３８７－３９４）。

[0101] これら４種の悪性中皮腫細胞株を０．０２％ ＥＤＴＡ溶液により剥離し、細胞をｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｂｕｆｆｅｒ ｓａｌｉｎｅ（ＰＢＳ）で洗浄し、１％ ｂｏｖｉｎｅ ｓｅｒｕｍ ａｌｂｕｍｉｎ（ＢＳＡ）を含むＰＢＳ（以下、ＢＳＡ－ＰＢＳと略記する）に、０．０５％ NaN_3および０．０２％ ＥＤＴＡを添加したバッファー（以下、ＦＣＭ ｂｕｆｆｅｒと略記する）に懸濁した。

[0102] 抗ＧＭ２抗体は、配列番号１０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨおよび配列番号１１のアミノ酸配列を含むＶＬからなる抗ＧＭ２ヒト化抗体（日本国特許第４５５０９４７号明細書、米国特許第６，８７２，３９２号明細書）を、α１，６－ｆｕｃｏｓｙｌｔｒａｓｆｅｒａｓｅ（ＦＵＴ８）のゲノム遺伝子をノックアウトしたＣＨＯ細胞（国際公開第２００５／０３５５８６号）を用いて作製したものを使用した。

[0103] 細胞懸濁液を、2×10^5ｃｅｌｌｓ／５０μＬ／ウェルとなるように９６ウェル Ｕ底プレートに分注した。被検試料としてＦＣＭ ｂｕｆｆｅｒで希釈した１０μｇ／ｍＬの抗ＧＭ２ヒト化抗体または抗ｄｉｎｉｔｒｏｐｈｅｎｙｌｈｙｄｒａｚｉｎｅ（ＤＮＰ）抗体（ネガディブコントロール）（Ｍｏｔｏｋｉ ｅｔ ａｌ，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，１１，３１２６－３１３５，２００５）を５０μＬ／ウェルでプレートに添加し、氷中で１時間反応させた。

[0104] 細胞をＰＢＳで３回洗浄した後、２次抗体として３００倍希釈したＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ４８８ ｇｏａｔ ａｎｔｉ－ｈｕｍａｎ ＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｐｒｏｂｅｓ社）を５０μＬ／ウェル加え、氷中、遮光下で３０分間反応させた。再びＰＢＳを用いて細胞を３回洗浄した後、細胞をＰＢＳに懸濁した。４８８ｎｍアルゴン－イオンレーザーで励起される５１０～５３０ｎｍの蛍光強度をフローサイトメーター（Ｃｙｔｏｍｉｃｓ Ｆｃ５００ＭＰＬ／Ｂｅｃｋｍａｎ ｃｏｕｌｔｅｒ社）で測定した。結果を図１に示す。

[0105] その結果、抗ＧＭ２抗体はいずれの悪性中皮腫細胞株にも反応した。抗ＧＭ２抗体および抗ＤＮＰ抗体が各細胞へ反応した時の、平均蛍光強度（ｍｅａｎ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ ｉｎｔｅｎｓｉｔｙ；ＭＦＩ）値は、それぞれＮＣＩ－Ｈ２２６（３３，１．５）、ＭＳＴＯ－２１１Ｈ（１８．８，１．０３）、ＡＣＣ－ＭＥＳＯ－１（２９８，１．１７）、ＮＣＩ－Ｈ２４５２（５７．９、１．２４）であった。よって悪性中皮腫４種は全てＧＭ２を発現していることが明らかになった。

[0106] 以上の結果から、臨床上の悪性中皮腫においてもＧＭ２が発現していることが示唆され、抗ＧＭ２抗体が悪性中皮腫に対する治療または診断に使用できることが明らかになった。

[0107] ［実施例２］抗体依存性細胞傷害活性（ＡＤＣＣ活性）の測定

２．１ 標的細胞懸濁液の調製

悪性中皮腫細胞株ＭＳＴＯ－２１１Ｈを回収し、５％ ｆｅｔａｌ ｂｏｖｉｎｅ ｓｅｒｕｍ（ＦＢＳ）を含むフェノールレッド不含ＲＰＭＩ－１６４０培地（ＷＡＫＯ社製）（以下、ＡＤＣＣ測定用培地と略記する）で洗浄し、同培地で１×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／５０μＬとなるように調製した。

[0108] ２．２ エフェクター細胞懸濁液の調製

エフェクター細胞としてＡＬＬＣｅｌｌｓ社より購入した凍結ヒト末梢血単核球（ｍｏｎｏｎｕｃｌｅａｒ ｃｅｌｌ；ＭＮＣ）を用いた。凍結ＭＮＣは溶解後、１０％ ｆｅｔａｌ ｃａｌｆ ｓｅｒｕｍ（ＦＣＳ）、ペニ

シリン、ストレプトマイシン、グルタミン、ｎｏｎ－ｅｓｓｅｎｔｉａｌ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ（ＮＥＡＡ）、ピルビン酸およびＨｅｐｅｓを含むＲＰＭＩ１６４０培地（全てｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）（以下、復帰培地と略記する）、２０ ｍＬに、５０μＬのＤＮａｓｅ Ｉ（ＤＮａｓｅ Ｉ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ，ＲＮａｓｅ－ｆｒｅｅ，ロシュ社）を添加した培地に懸濁した。

[0109] 遠心分離（４５０×ｇ，１０分間）後、再度２０ｍＬの復帰培地に懸濁し、５％ CO_2条件下、３７℃、２時間静置した。得られたｐｅｒｉｐｈｅｒａｌ ｂｌｏｏｄ ｍｏｎｏｎｕｃｌｅａｒ ｃｅｌｌ（ＰＢＭＣ）はＡＤＣＣ測定用培地で２回洗浄し、同培地で１×10^6ｃｅｌｌｓ／５０μＬとなるように調製し、エフェクター細胞懸濁液を作製した。

[0110] ２．３ ＡＤＣＣ活性の測定

９６ウェル Ｕ底プレートの各ウェルに、目的濃度に調製した抗ＧＭ２抗体、抗ＤＮＰ抗体（ネガティブコントロール）溶液を５０μＬ分注し、上述２．１で調製した標的細胞懸濁液を５０μＬ、上述２．２で調製したエフェクター細胞懸濁液を５０μＬ添加して、エフェクター細胞（Ｅ）と標的細胞（Ｔ）の比（Ｅ／Ｔ比）を１００にし、ＡＤＣＣ測定用培地を加えて全量を１５０μＬとした。

[0111] 遠心分離（５０×ｇ，３分間）を行い、３７℃で４時間反応させた。反応後、再度遠心分離（５０×ｇ，５分間）し、上清中の乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）活性をＣｙｔｏＴｏｘ ９６ Ｎｏｎ－Ｒａｄｉｏａｃｔｉｖｅ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ社）を用いて、添付の説明書に従って測定した。

[0112] ＡＤＣＣ活性は次式により求めた。

Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ（％）＝（［検体の吸光度］－（［エフェクター細胞自然遊離の吸光度］＋［標的細胞自然遊離の吸光度］））／（［全標的細胞遊離の吸光度］－［標的細胞自然遊離の吸光度］）ｘ１００

[0113] ここで標的細胞自然遊離の値は、標的細胞溶液５０μＬ、培地１００μＬ

を加えたウェルを調製し、また標的細胞およびエフェクター細胞自然遊離の値は、標的細胞溶液、エフェクター細胞溶液、培地をそれぞれ５０μＬ加えたウェルを調製して、各ウェルの吸光度を測定して得た。

[0114] 全標的細胞遊離の値は、標的細胞溶液５０μＬ、培地８５μＬを加え、反応終了４５分前にキットに付属のＬｙｓｉｓ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎを１５μＬ添加したウェルを調整し、同様にして得た。結果を図２（ａ）および（ｂ）に示す。

[0115] その結果、悪性中皮腫細胞株ＭＳＴＯ－２１１Ｈは、抗ＧＭ２抗体の抗体濃度依存的に傷害された。よって、抗ＧＭ２抗体が悪性中皮腫細胞に対し、ＡＤＣＣ活性を惹起することが確認された。

[0116] 以上の結果より、悪性中皮腫患者に投与された抗ＧＭ２抗体は、患者体内に存在するエフェクター細胞を介して癌細胞を傷害し得ることが示唆された。

[0117] ［実施例３］ＳＣＩＤマウスの悪性中皮腫細胞株ＭＳＴＯ－２１１Ｈ同所移植モデルを用いた抗ＧＭ２抗体の薬効評価

癌細胞移植の２日前に各ＳＣＩＤマウス（日本クレア社）に３００μｇの抗ＴＭ－β１抗体（抗マウスＩＬ－２受容体β鎖抗体）［Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４７，２２２２（１９９１）］を投与した。癌細胞移植当日、マウスにエーテル麻酔を行い、右胸壁の毛剃りを行った。皮膚、皮下組織に切り込みを入れ、壁側胸膜を露出させた。２７Ｇシリンジを使用し、壁側胸膜を通じて１×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／１００μＬのＭＳＴＯ－２１１Ｈ細胞懸濁液を胸腔内に投与し、傷口を縫合した。

[0118] 抗ＧＭ２抗体の中皮腫治療効果を評価するため、癌細胞移植後７、１４日後に１０μｇの抗ＧＭ２ヒト抗体を静脈内投与した。

[0119] また、ヒト免疫細胞の寄与についても評価するために、健常人末梢血液よりＬｙｍｐｈｏｃｙｔｅ　Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎ　Ｍｅｄｉｕｍ（ＬＳＭ）を用いて分離した、１×１０^{6}ｃｅｌｌｓのヒト単核球（ＭＮＣ）を、癌細胞移植後７、１４日後に静脈内投与した。移植後２１日目にマウスを屠殺し、

胸部腫瘍の有無、サイズ、胸水の有無および胸水量を調べた。また、統計的有意差については、ダネットの多重比較検定により求めた。結果を図３、表１に示す。

[0120] [表1]

処置	用量	胸部腫瘍			胸水		
		発生率	質量（mg）		発生率	容量（μL）	
			中央値	範囲		中央値	範囲
コントロール	DW	8/8	550	380-650	3/8	0	0-300
MNC	1×10^6細胞	8/8	590	380-640	2/8	0	0-200
GM2Ab	10μg	7/8	360＊	0-590	1/8	0	0-250
GM2Ab+MNC	10、1×10^6細胞	4/8	＜10＊	0-510	1/8	0	0-150

[0121] その結果、抗ＧＭ２抗体を投与したマウスでは、抗体を投与していないマウスおよびヒトＭＮＣを投与したマウスと比べて、胸部腫瘍の発生率および平均腫瘍質量の有意な減少が認められた。また、胸水貯留の発生率の低下も認められた。

[0122] 更に、抗ＧＭ２抗体とヒトＭＮＣとの両方を投与したマウスでは、ヒトＭＮＣを投与したマウスおよび抗ＧＭ２抗体を投与したマウスのいずれよりも、胸部腫瘍の発生率および平均腫瘍質量の減少が認められた。よって、ヒトＭＮＣの単独投与では、抗腫瘍効果が認められなかったことから、ヒトＭＮＣは抗ＧＭ２抗体の抗腫瘍効果を増強し、その結果高い薬効が得られたものと考えられた。

[0123] 本結果から、悪性中皮腫患者に対して抗ＧＭ２抗体が有効である可能性が示唆された。

[0124] ［実施例４］ＳＣＩＤマウスにおける悪性中皮腫細胞株ＭＳＴＯ－２１１Ｈの同所移植モデルでのＧＭ２発現

ヒト悪性中皮腫細胞株ＭＳＴＯ－２１１Ｈを移植したマウス胸部より腫瘍ブロックを摘出し、ＯＣＴ　ｃｏｍｐｏｕｎｄに包埋した。包埋したブロックを約６μｍに薄切し、各凍結組織切片を作製し、免疫組織染色を以下の方法で実施した。

[0125] （１）組織切片を無水アセトン中で、室温にて５分間固定後、３０分間風乾

させた。

（２）組織切片を流水中で５分間洗浄した。

（３）組織切片を１０倍希釈濃度のＭＯＲＰＨＯＳＡＶＥ中で、室温にて１５分間固定した後、ＰＢＳで５分間、２回洗浄した。

（４）組織切片を内在性ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ ｂｌｏｃｋｉｎｇ ｓｏｌｕｔｉｏｎ（２Ｕ／ｍＬ Ｇｌｕｃｏｓｅ ｏｘｉｄａｓｅ，１０ｍｍｏｌ／Ｌ Ｇｌｕｃｏｓｅ，１ｍｍｏｌ／Ｌ Ｓｏｄｉｕｍ ａｚｉｄｅ）中で３７℃にて、６０分間反応後、ＰＢＳで５分間、２回洗浄した。

[0126] （５）組織切片をＢＳＡ－ＰＢＳ（１ｗ／ｖ％ ＢＳＡ ｉｎ ＰＢＳ）中で、室温にて１０分間反応させた。

（６）抗ＧＭ２抗体（一次抗体）と、一次抗体の１．５倍濃度の二次抗体［（Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ－ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ ａｆｆｉｎｉｐｕｒｅ ｄｏｎｋｅｙ ａｎｔｉ－ｈｕｍａｎ ＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）］（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を等量混ぜ、組織切片を４℃にて一晩反応させた。

[0127] 次に、二次抗体の１００倍濃度のＩｇＧ ｆｒｏｍ ｈｕｍａｎ ｓｅｒｕｍ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社製）を添加し、さらに４℃にて、２時間反応させた溶液を調製し、ｐｒｅｃｏｍｐｌｅｘ ｍｉｘｔｕｒｅを作製した。このｐｒｅｃｏｍｐｌｅｘ ｍｉｘｔｕｒｅ中で組織切片を、室温にて２時間反応させた後、ＰＢＳで５分間、３回洗浄した。

[0128] （７）組織切片を、１５ｍｇのＤＡＢ ｔａｂｌｅｔを１００ｍＬのＰＢＳで溶解し、３３．３μＬの３０％過酸化水素溶液を添加した溶液（ＤＡＢ ｓｕｂｓｔｒａｔｅ ｃｈｒｏｍｏｇｅｎ）中で、室温にて２分間、反応させた後、ＰＢＳで５分間、３回洗浄した。

[0129] （８）組織切片をＨｅｍａｔｏｘｙｌｉｎ中で反応させ、その後流水中で１０分間洗浄した。

（９）組織切片をエタノール溶液で脱水後、ｘｙｌｅｎｅで封入した。

染色後の切片は顕微鏡で観察し、以下の基準を用いて分類し、また、染色部

位（細胞質、細胞膜）を確認した。結果を表２に示す。

[0130] [表2]

	抗体	抗GM2抗体						ヒトIgG1		
		20 μg/mL			2 μg/mL			20 μg/mL		
ゼノグラフト	組織/細胞	S	I	F	S	I	F	S	I	F
MSTO-211H	腫瘍細胞	C, M	3+	4	C, M	3+	4		Neg	
	他の組織		Neg			Neg			Neg	

部位と染色の記述; M: 細胞膜, C: 細胞質.
染色強度のクライテリア; Neg: ﾈｶﾞﾃｨﾌﾞ, 1+:非常にかすかな, 2+:淡い, 3+:中等, 4-:暗い.
染色頻度のクライテリア; Neg (未標識細胞"ﾈｶﾞﾃｨﾌﾞ"), 1:<25%, 2:>=25%, <50%, 3:>=50% および <75%, 4:>=75%.
S: 部位. I: 強度. F: 頻度.

[0131] その結果、マウス胸腔内に同所移植したヒト悪性中皮腫細胞株ＭＳＴＯ－２１１Ｈの腫瘍において、細胞膜および細胞質が染色された。よって、同所移植された中皮腫細胞の細胞膜および細胞質にＧＭ２が発現していることが明らかになった。

[0132] ［実施例５］ヒト悪性中皮腫凍結組織を用いた蛍光免疫組織化学染色によるＧＭ２発現解析

ＯＣＴ　ｃｏｍｐｏｕｎｄに包埋されたヒト悪性中皮腫凍結切片あるいは、ヒト悪性中皮腫凍結ブロックをＯｒｉｇｅｎｅ社より入手し、蛍光免疫組織染色を実施した。ドナー情報を図４に示す。

[0133] また、比較対象として、ヒト悪性中皮腫細胞株ＭＳＴＯ－２１１Ｈを同所移植したＳＣＩＤマウス胸部より腫瘍ブロックを摘出し、ＯＣＴ　ｃｏｍｐｏｕｎｄに包埋した凍結組織ブロックを用いた。凍結ブロックを薄切して作製した切片を用いた。以下の手順で染色を行った。

[0134] （１）凍結切片を無水アセトン中で、室温にて５分間固定後、３０分間風乾させた。

（２）凍結切片をＰＢＳで５分間洗浄した。

（３）凍結切片を、ｄｄＨ$_2$Ｏで１μｇ／ｍＬに調製したＤＡＰＩ中で室温にて２０分間反応させた。

（４）凍結切片をＰＢＳで５分間洗浄した。

（５）凍結切片を５％　ＦＢＳ－ＰＢＳ中で、室温にて１０分間反応させた。

（６）凍結切片をＰＢＳで３０μｇ／ｍＬに調製した１次抗体（Ａｌｅｘａ

４８８標識ＢＩＷ－８９６２またはＡｌｅｘａ４８８標識抗ＤＮＰ抗体）中で、４℃にて、６時間反応させた。

（７）凍結切片をH_2Oで１分間３回洗浄した。

（８）凍結切片にカバーガラスを載せ、蛍光顕微鏡にて観察し、以下の基準を用いて分類した。結果を表３に示す。

[0135] 表３において、染色強度は、０：染色なし，１：ごく弱い染色，２：明らかな染色，３：強い染色を示す。

[0136]

[表3]

サンプル	頻度 (%)	染色強度	ストローマ染色	組織型
FR0001D4BA	0	0		B
FR00020029	30	2		B
FR0002081F	0	0		Meso
FR000265FD	0	0		Meso
FR0002731F	30	3		Meso
FR00026B23	0	0		B
FR000265A2	0	0		B
FR0002939E	80	2		B
FR00035469	30	1	強い	Meso
FR000011E5	0	0		Meso
FR00002E6B	0	0	中等	Desmoplastic
FR00006328	50	3		Meso
FR00006A38	0	0		Meso
FR00018ABD	100	2	強い	Desmoplastic
FR00016972	0	0		Desmoplastic
SX00002843	90	1	強い	E
FR00005932	10	1	強い	Meso
FR00004AF8	40	3	強い	B
FR00005E39	80	3		Desmoplastic
FR00017430	100	3		Meso
FR0001A6C1	100	1	強い	B+Desmoplastic
FR0001CA2A	100	3		NR
FR0001742F	50	3		Meso
FR000265FE	20	2		Meso
FR000293A0	0	0		B
FR00002E64	0	0		E
陽性コントロール				
MSTO-211H	90	3		

注）組織型についてBは二相型、Eは上皮型、Mesoは細分類されていない中皮腫、Desmoplasticは線維形成型、NRは未報告、をそれぞれ示す。

[0137] この結果、２６検体中１５検体で腫瘍細胞において強度１～３のＧＭ２発現が認められた。また、陽性対照として用いたヒト悪性中皮腫細胞株ＭＳＴＯ－２１１Ｈの同所移植マウス由来の腫瘍組織切片と比較して、７検体（２７％）で同等以上の強い反応性が認められた。

よって、ヒト臨床の悪性中皮腫においてガングリオシドＧＭ２ が高発現し

ていることが明らかになった。

[0138] 本発明を特定の態様を用いて詳細に説明したが、本発明の意図と範囲を離れることなく様々な変更および変形が可能であることは、当業者にとって明らかである。なお本出願は、２０１２年１２月６日付で出願された米国仮出願（６１／７３４０８７）に基づいており、その全体が引用により援用される。

配列表フリーテキスト

[0139] 配列番号１：ＨＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号２：ＨＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号３：ＨＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号４：ＬＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号５：ＬＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号６：ＬＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号７：ヒト化ＶＨのアミノ酸配列

配列番号８：ヒト化ＶＬのアミノ酸配列

配列番号９：ヒト化ＶＬのアミノ酸配列

配列番号１０：ヒト化ＶＨのアミノ酸配列

配列番号１１：ヒト化ＶＬのアミノ酸配列

請求の範囲

[請求項1] ガングリオシドＧＭ２に結合する抗体又は該抗体断片を有効成分として含有する、中皮腫の治療剤または診断剤。

[請求項2] 前記中皮腫が、胸膜中皮腫、腹膜中皮腫および心膜中皮腫から選ばれるいずれか１つの中皮腫である、請求項１に記載の治療剤または診断剤。

[請求項3] 前記胸膜中皮腫または腹膜中皮腫が、悪性胸膜中皮腫または悪性腹膜中皮腫である、請求項２に記載の治療剤または診断剤。

[請求項4] 前記抗体が、ＧＭ２のα２－３結合したシアル酸（ＳＡ）に結合する抗体である、請求項１～３のいずれか１項に記載の治療剤または診断剤。

[請求項5] 前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項１～４のいずれか１項に記載の治療剤または診断剤。

[請求項6] 前記抗体が、遺伝子組換え抗体である、請求項１～５のいずれか１項に記載の治療剤または診断剤。

[請求項7] 前記遺伝子組換え抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体から選ばれるいずれか１つの抗体である、請求項６に記載の治療剤または診断剤。

[請求項8] 前記抗体が、配列番号１～３のそれぞれに表されるアミノ酸配列を含む重鎖（以下、Ｈ鎖）の相補性決定領域（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ ｒｅｇｉｏｎ；ＣＤＲ、以下ＣＤＲと略記する）１～３および配列番号４～６のそれぞれに表されるアミノ酸配列を含む軽鎖（以下、Ｌ鎖）ＣＤＲ１～３を含む抗体である、請求項１～７のいずれか１項に記載の治療剤または診断剤。

[請求項9] 前記抗体が、配列番号７で表されるアミノ酸配列を含むＨ鎖可変領域（以下、ＶＨと記す）および配列番号８で表されるアミノ酸配列を含むＬ鎖可変領域（以下、ＶＬと記す）からなる抗体、配列番号７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨおよび配列番号９で表されるアミノ

酸配列を含むＶＬからなる抗体、配列番号１０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨおよび配列番号８で表されるアミノ酸配列を含むＶＬからなる抗体、並びに配列番号１０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨおよび配列番号１１で表されるアミノ酸配列を含むＶＬからなる抗体から選ばれるいずれか１つの抗体である、請求項１～８のいずれか１項に記載の治療剤または診断剤。

[請求項10] 少なくとも１つの併用剤を含む、請求項１～９のいずれか１項に記載の治療剤または診断剤。

[請求項11] 前記併用剤が化学療法剤およびタンパク医薬から選ばれる少なくとも１つである、請求項１０に記載の治療剤または診断剤。

[請求項12] ガングリオシドＧＭ２に結合する抗体又は該抗体断片を有効成分として用いる、中皮腫の治療方法または診断方法。

[請求項13] 中皮腫の治療剤を製造するための、ガングリオシドＧＭ２に結合する抗体又は該抗体断片の使用。