

ロット分析によって検出する、請求項 2 記載の方法。

【請求項 13】

前記少なくとも 1 つの抗体が、RM2 モノクローナル抗体によって認識されるエピトープに対するものである、請求項 10 記載の方法。

【請求項 14】

前記少なくとも 1 つの抗体が、RM2 モノクローナル抗体によって認識されるエピトープに対するものである、請求項 11 記載の方法。

【請求項 15】

前記少なくとも 1 つの抗体が、RM2 モノクローナル抗体によって認識されるエピトープに対するものである、請求項 12 記載の方法。

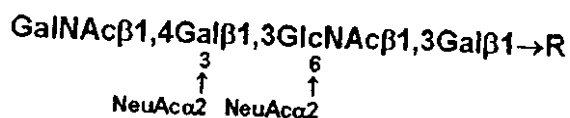
10

【請求項 16】

前立腺癌の診断キットであって、

(a) 以下に示すエピトープ構造を有する RM2 抗原に特異的に結合する少なくとも 1 つの部分であって、前立腺癌が疑われる患者から取得した検体に由来する前記部分

【化 2】



20

(式中、R は担体を表す)、

(b) 当該キットを用いて前立腺癌を診断するための説明書、

(c) 任意に、前記部分の前記抗原への特異的結合によって前記抗原の有無を検出する手段

を含む前記キット。

【請求項 17】

前記 RM2 抗原に特異的に結合する部分が抗体である、請求項 16 記載のキット。

【請求項 18】

前記抗体が、ポリクローナル抗体、一本鎖ポリクローナル抗体、ポリクローナル抗体断片、モノクローナル抗体、一本鎖モノクローナル抗体、モノクローナル抗体断片、キメラ抗体、一本鎖キメラ抗体、キメラ抗体断片、リサーフェスド抗体、リサーフェスド一本鎖抗体、リサーフェスド抗体断片、ヒト化抗体、ヒト化一本鎖抗体、及びヒト化抗体断片からなる群より選択される、請求項 16 記載のキット。

30

【請求項 19】

前記 RM2 抗原に特異的に結合する部分が抗体である、請求項 16 記載のキット。

【請求項 20】

前記 RM2 抗原に特異的に結合する部分がモノクローナル抗体である、請求項 16 記載のキット。

【請求項 21】

前記 RM2 抗体に特異的に結合する部分が、RM2 モノクローナル抗体によって認識されるエピトープに対するものである、請求項 16 記載のキット。

40

【請求項 22】

前記検体が前立腺生検サンプルである、請求項 16 または 17 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 23】

前記検体が前立腺全切除術検体である、請求項 16 または 17 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 24】

前記検体が血清サンプルである、請求項 16 または 17 のいずれか一項に記載のキット

50

【請求項 25】

前記抗原の有無を、免疫組織学；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（SDS-PAGE）後のウェスタンブロット分析；前記抗原に結合する一次抗体に対する標識二次抗体；表面プラズモン共鳴（SPR）分光法；または原子間力顕微鏡検査法によって検出する、請求項 16 記載のキット。

【請求項 26】

前記検体が前立腺生検サンプルであり、前記抗原の有無を免疫組織学、前記抗原に結合する一次抗体に対する標識二次抗体、表面プラズモン共鳴（SPR）分光法、または、原子間力顕微鏡検査法によって検出する、請求項 17 記載のキット。

【請求項 27】

前記検体が前立腺全切除術検体であり、前記抗原の有無を免疫組織学、前記抗原に結合する一次抗体に対する標識二次抗体、表面プラズモン共鳴（SPR）分光法、または、原子間力顕微鏡検査法によって検出する、請求項 17 記載のキット。

10

【請求項 28】

前記検体が血清サンプルであり、前記抗原の有無を SDS-PAGE 後にウェスタンブロット分析によって検出する、請求項 17 記載のキット。

【請求項 29】

前記検体が体内分泌物由来のサンプルであり、前記抗原の有無を SDS-PAGE 後にウェスタンブロット分析によって検出する、請求項 17 記載のキット。

【請求項 30】

前記少なくとも 1 つの抗体が、RM2 モノクローナル抗体によって認識されるエピトープに対するものである、請求項 26 記載のキット。

20

【請求項 31】

前記少なくとも 1 つの抗体が、RM2 モノクローナル抗体によって認識されるエピトープに対するものである、請求項 27 記載のキット。

【請求項 32】

前記少なくとも 1 つの抗体が、RM2 モノクローナル抗体によって認識されるエピトープに対するものである、請求項 28 記載のキット。

【請求項 33】

RM2 抗原を含む、単離された前立腺組織サンプル。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、特定の炭水化物抗原をヒト前立腺癌関連抗原として同定することに関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

米国における前立腺癌は 2.75 分毎に診断され、230,000 件以上の新たな症例が毎年発生している。前立腺癌は男性の間で最もよく診断される癌であり（新規癌症例全体の 32% 以上）、推定 29,900 人の男性が前立腺癌で毎年亡くなっている。前立腺癌は、米国ではあらゆる種類の癌の中で最も発病率が高くなっている。似たような動向が他の先進国でも認められている。

40

【0003】

前立腺特異的抗原（prostate-specific antigen; PSA）が現在前立腺癌の診断に利用されており、その理由は、血清中の抗原レベルの増加（ $> 6.1 \text{ ng/ml}$ ）が当該疾患と関連することが多いためである。しかしながら、PSA はタンパク質抗原であり、前立腺癌だけでなく正常な前立腺にも見られる。PSA レベルの増加は良性前立腺肥大症（BPH）や前立腺炎とも関連しており、従って、前立腺癌の決定的な指標ではない。

【0004】

50

異常な糖鎖形成（細胞表面における異常な炭水化物鎖の形成）は多くの種類の癌で発生する。異常糖鎖形成のパターンと、特定の種類の癌に関連する特定のグリコシルエピトープの発現とを診断基準として利用し、多種類のヒトの癌の診断が行われている。

【0005】

ヒト前立腺癌と関連して発現するが、正常な前立腺またはBPHとは関連せずに発現する異常な炭水化物鎖について検索が行われている。本発明はこのような構造の同定に関するものであり、当該構造は「RM2抗原」（1,4-GalNAc-ジシアリル-Lc₄）と呼ばれ、モノクローナル抗体（mAb）RM2に特異的に結合する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0006】

発明の要旨

本発明は、腎細胞癌（RCC）抗原に関する従前の検索結果を前立腺癌の研究に応用したものである。元々は、RCC細胞株TOS1を免疫原として使用してRCCと反応するmAbを取得し、このmAbを「RM2」と命名した。RM2によって認識される抗原の構造は、後から1,4-GalNAc-ジシアリル-Lc₄と同定されたのである（図1）。RCCは比較的珍しい種類の癌であり、RCCの全てがこの構造を発現するわけではない。泌尿生殖器系の臓器は共通の胚発生をたどるため、RM2抗原の発現について、様々な病期に相当する35例の前立腺癌症例にて系統的な検査を行った。これら35例の全てにおいて、mAb RM2に対する陽性の反応性、即ち、RM2抗原の存在が示された。18例が中または強陽性であり、17例が弱陽性であった。35例全ての正常腺では陰性または非常に弱い染色が観察され、6例のBPH症例では染色が観察されなかった。中央値グリーソンスコア（悪性度の指標）は、中/強陽性例および弱陽性例でそれぞれ8および7であった。

【0007】

BPHにおけるRM2のネガティブ発現は、RM2の診断応用にとって特別な関連がある。PSAアッセイでは、僅か～中程度の上昇値（4～10ng/ml）であればBPHと関連する場合が多い。RM2はBPHでは発現しないため、前立腺癌をBPHと識別するRM2の識別能は、PSA値が4～10ng/mlの範囲で上昇した男性の中から血清RM2試験を利用して生検症例を選択する上で極めて有用である。根治前立腺切除術検体9例のうち、5例で中/強陽性（m/s）染色が認められ、4例で弱陽性（w）染色が認められた。5例のm/s染色のうち4例は病理学的に臓器非限局性であり、これに対し、4例のw染色のうち4例とも臓器限局性であった。検査した症例数は少ないものの、RM2陽性と病理学的病期との間には明らかな相関がある（ $p < 0.02$ ）。臨床的に限局性の前立腺癌において病理学的病期を予測することは、治療の選択肢（即ち、根治前立腺切除術か放射線療法か）を選択する上で非常に重要である。これらのデータから、臨床的に限局性の前立腺癌における病理学的病期を予測するのにもRM2が有用である可能性は明らかである（病理学的に臓器非限局性の癌は当時の根治前立腺切除術の約40%で認められる）。

【0008】

当時のデータによれば、PSA試験を受けた男性患者の大半が4～10ng/mlのPSA値を示した。しかも、この範囲のPSA値を有する患者のうち僅か25%が生検によって前立腺癌であることが判明し、即ち、「高」PSA値を示す患者の70%より多くが前立腺癌ではなかったのである。この試験を世界規模で使用することは、金銭、時間および労力の甚だしい浪費を意味し、かつ、患者の心理的ストレスを意味する。

【0009】

このような理由から、ヒト前立腺癌と関連して発現するが、正常な前立腺またはBPHとは関連せずに発現する特定の抗原を見出すことが、非常に重要な医学上の進歩となる。本発明は前立腺癌の診断方法を提供するものであり、当該方法は、以下に示すエピトープ構造を有するRM2抗原の有無またはそのレベルの上昇を、前立腺癌が疑われる患者に由来する検体において検出することを含む

10

20

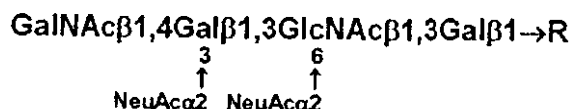
30

40

50

【 0 0 1 0 】

【 化 1 】



【 0 0 1 1 】

(式 中 、 R は 担 体 を 表 す) 。

【 0 0 1 2 】

10

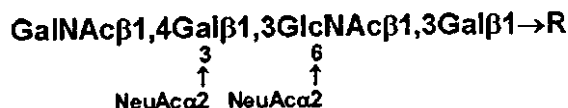
好適な実施態様では、R M 2 抗原に特異的に結合する抗体によってR M 2 抗原を検出する。より好適な実施態様では、当該抗体はR M 2 モノクローナル抗体である。

【 0 0 1 3 】

本発明は、また、前立腺癌の診断キットを提供するものであり、当該キットには (a) 以下に示すエピトープ構造を有するR M 2 抗原に特異的に結合する少なくとも1つの部分であって、前立腺癌が疑われる患者から取得した検体に由来する前記部分

【 0 0 1 4 】

【 化 2 】



20

【 0 0 1 5 】

(式 中 、 R は 担 体 を 表 す) 、

(b) 当該キットを用いて前立腺癌を診断するための説明書、

(c) 任意に、前記部分の前記抗原への特異的結合によって前記抗原の有無を検出する手段

が含まれる。

発明の詳細な説明

30

A . R M 2 抗原および抗体 ヒトの腫瘍の特徴は、スフィンゴ糖脂質または糖タンパク質のいずれかに結合する特定の炭水化物抗原を発現する点にある (Hakomori, S. 1989 Adv. Cancer Res. 52, 257-331; Hakomori, S. 1996 Cancer Res. 56, 5309-5318) という一般的な概念に基づいて、R C C で高度に発現する低移動性ガングリオシドの存在を実証した (Saito, S., Orikasa, S., Ohyama, C., Satoh, M., and Fukushi, Y. (1991) Int. J. Cancer 49, 329-334) 。モノクローナル抗体R M 2 は、マウスをR C C 細胞株T O S 1 で免疫し、R C C 組織に発現した低移動性ガングリオシドを認識する抗体を分泌するハイブリドーマのクローニングを繰り返すことで樹立した (Saito, S., Levery, S.B., Salyan, M. E. K., Goldberg, R. I., and Hakomori, S. 1994 J. Biol. Chem. 269, 5644-5652) 。さらに、m A b R M 2 によって認識される抗原 (「 R M 2 抗原」と呼ぶ) の構造に関する系統的研究を一次元および二次元¹ H - N M R 並びに質量分析にて行ったところ、当該抗原が 1 , 4 - G a l N A c - ジシアリル - L c₄ であることが明らかとなった (図 1) 。当該構造は極めて新規であり、「ガングリオシリーズ (ganglio-series) 」 (図 1 の領域 1) 群と「ジシアリルラクトシリーズ (disialyl lacto-series) 1 型鎖」 (図 1 の領域 2) 群とからなる (Ito, A., Levery, S. B., Saito, S., Satoh, M., and Hakomori, S. 2001 J. Biol. Chem. 276, 16695-16703) 。

40

B . 前立腺癌関連抗原としてのR M 2 抗原 泌尿生殖器系の組織および臓器は個体発生的に関連しているため、本発明者らは、R C C で発現する抗原が、発病率と死亡率が高い他の泌尿生殖器系の癌 (特に前立腺癌) でも発現する可能性があると仮定した。40例の前立腺癌症例からの生検サンプルについて予備研究を行った。生検サンプルには癌の全段階

50

が含まれ、その大部分は症状が進行した段階である。即ち、生検サンプルの約66%を「臓器非限局性」前立腺癌患者から取得した。標準的な組織学手法で組織をホルマリン固定およびパラフィン包埋した。40サンプルのうち、35サンプルで構造の良好な保存が認められ、免疫組織学の結果を評価することができた。これら35サンプルの全てにおいて、RM2抗体に対する陽性の反応性が認められた。18例が中または強陽性であり、17例が弱陽性であった。これらの症例を以下に示す。

生検検体

1. 中/強陽性例 (18例)

- ・年齢 (中央値) : 72.5歳
- ・PSA値 (中央値) : 40 ng/ml (範囲 : 2.5 ~ 3797 ng/ml) 10
- ・グリーソンスコア (中央値) : 8 (全18例に対して)
 - 3例でスコア6
 - 5例でスコア7
 - 3例でスコア8
 - 7例でスコア9
- ・臨床病期
 - 限局度 (T)
 - T2以下 : 6例
 - T3以上 : 12例
 - 転移有り 20
 - D2期 (所属リンパ節を超えて骨または遠隔リンパ節へ転移) : 5例
 - D1期 (所属リンパ節へ転移) : 1例
 - 転移無し
 - T1c ~ T4N0M0 : 12例
 - (T1c : 4例、T2 : 2例、T3 : 5例、T4 : 1例)

2. 弱陽性例 (17例)

- ・年齢 (中央値) : 71歳
- ・PSA値 (中央値) : 37 ng/ml (範囲 : 7 ~ 1723 ng/ml) 30
- ・グリーソンスコア (中央値) : 7 (全17例に対して)
 - 3例でスコア6
 - 7例でスコア7
 - 4例でスコア8
 - 3例でスコア9
- ・臨床病期
 - 限局度 (T)
 - T2以下 : 6例
 - T3以上 : 11例
 - 転移有り 40
 - D2期 (所属リンパ節を超えて骨または遠隔リンパ節へ転移) : 4例
 - D1期 (所属リンパ節へ転移) : 1例
 - 転移無し
 - T1c ~ T3N0M0 : 12例
 - (T1c : 3例、T2 : 3例、T3 : 6例)

根治前立腺切除術検体 (全9例)

- ・年齢 (中央値) : 65歳
- ・PSA (中央値) : 6.1 ng/ml (範囲 : 4.4 ~ 13.2 ng/ml)

1. 中/強陽性例 (5例)

- ・グリーソンスコア7 : 3例
- ・グリーソンスコア8 : 1例
- ・グリーソンスコア9 : 1例 50

- ・臓器非限局型 (p T 3 以上) : 4 例
- ・臓器限局型 (p T 2 以下) : 1 例

2 . 弱陽性例 (4 例)

- ・グリーソンスコア 8 : 2 例
- ・グリーソンスコア 9 : 2 例
- ・臓器限局型 (p T 2 以下) : 4 例

C . 腫瘍細胞の糖タンパク質としての R M 2 抗原 R M 2 抗原は、上記 A . 節に記載したように、元々はスフィンゴ糖脂質 (ジシアロガングリオシド) として見出されたものである。しかしながら、腫瘍細胞に存在するこの抗原の一部は、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 (S D S - P A G E) 後にウェスタンブロット分析を行うことで検出可能である。簡単に言うと、細胞を氷上へ置き、氷冷 P B S で洗浄して細胞溶解バッファー (2 0 m M トリス p H 7 . 4 、 1 5 0 m M N a C l 、 2 m M E D T A 、 1 % N P 4 0 、 5 0 m M N a F 、 1 0 μ g / m l アプロチニン、 1 0 μ g / m l ロイペプチン、 1 m M P M S F 、 1 m M N a ₃ V O ₄) で溶解した。抽出物を 1 2 , 0 0 0 r p m で 5 分間遠心分離することにより清澄化した。等量のタンパク質を含む溶解産物を、 1 0 % S D S - P A G E 電気泳動で分離し、次いで H y b o n d P P V D F 膜 (Amersham Biosciences) へ転写した。膜を 1 % B S A 含有 T B S - T w e e n でブロックし、次いで一次抗体と共にインキュベートした。結合した抗体を、適当なペルオキシダーゼ結合二次抗体、次いで増感化学発光検出装置 (E C L 、 Boehringer Mannheim) を用いて検出した。

10

20

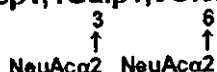
【 0 0 1 6 】

重要な点は、糖タンパク質抗原がスフィンゴ糖脂質抗原よりも容易に細胞から放出されることである。血清検査の際に診断プローブとして用いられる多くの腫瘍関連抗原は、スフィンゴ糖脂質ではなく糖タンパク質である。

D . 前立腺癌の診断方法 : 本発明は前立腺癌の診断方法を提供するものであり、当該方法は、以下に示すエピトープ構造を有する R M 2 抗原の有無またはそのレベルの上昇を、前立腺癌が疑われる患者に由来する検体において検出することを含む

【 0 0 1 7 】

【 化 3 】



30

【 0 0 1 8 】

(式中、 R は担体を表す) 。

【 0 0 1 9 】

当該方法は、悪性前立腺癌から B P H を識別するのに特に有用である。

【 0 0 2 0 】

適切な担体としては、 (i) 糖タンパク質に N - 結合または O - 結合したラクトサミン鎖、 (i i) スフィンゴ糖脂質中の 4 G l c 1 - 1 C e r 、 (i i i) 他の任意の天然または合成担体分子などが挙げられる。

40

【 0 0 2 1 】

前立腺癌を診断する際に使用に適した検体としては、前立腺癌組織の生検材料、前立腺全切除術 (total prostatectomy) 検体、血清などが挙げられる。

【 0 0 2 2 】

本発明によれば、前立腺癌の診断方法は、 R M 2 抗原の有無またはそのレベルの上昇が前立腺癌の発生と相関する検体において、当該抗原の有無またはそのレベルの上昇を検出できる方法であれば、どのような方法でもよい。 R M 2 抗原の有無またはそのレベルの上昇を検出する方法の例としては、「サンドイッチ」イムノアッセイ、エレクトロスプレー

50

イオン化 (ESI)、マトリックス支援レーザーイオン化 (MALDI) 質量分析 (MS)、表面プラズモン共鳴 (SPR) 分光法などが挙げられる。

【0023】

P S A 分析で実施されているような二重モノクローナルアッセイ (McCormack RT, et al, "Molecular forms of prostate-specific antigen and the human kallikrein gene family: a new era", Urology 45(5):729-44, 1995; Karazanashvili G, Abrahamsson P A, "Prostate specific antigen and human glandular kallikrein 2 in early detection of prostate cancer", J. Urology 169(2):445-457, 2003) を利用した「サンドイッチ」法を用いると、ウェスタンブロット分析から明らかのように、R M 2 抗原に対して反応性の 49 k D a の糖タンパク質が、腫瘍細胞から放出される主な糖タンパク質であることが判明した。さらに、R M 2 を用いたウェスタンブロット分析により、微量の糖タンパク質バンド (88 k D a、98 k D a、130 k D a) も各種前立腺癌細胞株で検出された (図 5 A およびその説明を参照)。これらの R M 2 反応性糖タンパク質は、アンドロゲン依存性の L N C a p 細胞およびアンドロゲン非依存性の P C 3 細胞の双方で認められた。R M 2 の他に、これらの前立腺癌細胞株で発現する R M 2 以外のエピトープに対するモノクローナル抗体を組み合わせれば、二重モノクローナル抗体アッセイを利用した効率の良いサンドイッチ法の設計に有用である。

10

【0024】

エレクトロスプレーイオン化やマトリックス支援レーザー脱離/イオン化質量分析の著しい進歩により、これらの方法を応用して特定の癌を有する患者の血清中の腫瘍関連糖タンパク質が分析されている (例えば、Johnson PJ, et al, "Structures of disease-specific serum alpha-fetoprotein isoforms", Br. J. Cancer 83(10):1330-1337, 2000; Poon TC, et al, "Comprehensive proteomic profiling ... of hepatocellular carcinoma and its subtypes", Clin. Chem. 49(5):752-760, 2003)。この線に沿うと、S E L D I - T O F - M S (表面増感レーザー脱離/イオン化飛行時間質量分析) が糖タンパク質抗原の特性決定に有用である (Merchant M, Weinberger SR, "Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry", Electrophoresis 21:1164-1167, 2000)。実際、患者血清中の R M 2 糖タンパク質は、ゲル上に付着させた抗体によって捕捉することができ、その後、吸着抗原を溶出させて E S I - M S、M A L D I - M S または S E L D I - T O F - M S 分析を行った。

20

30

【0025】

表面プラズモン共鳴分光法は高感度であり、弱い相互作用を検出することが可能である (Matsuura K, et al, "A quantitative estimation of carbohydrate-carbohydrate interaction ... by surface plasmon resonance", J. Am. Chem. Soc. 122(30):7406-7407, 2000; Hernaiz MJ, et al, "A model system mimicking glycosphingolipid clusters to quantify carbohydrate self-interactions by surface plasmon resonance", Angew. Chem Intl. Ed. 41(9):1554-1557, 2002)。これは、表面プラズモン層に付着させた抗体へ結合させることにより患者血清中の抗原を測定する有望な方法である。例えば、金膜上に付着させた R M 2 抗体の F a b 誘導体 (「自己集合単層 (self-assembled monolayer)」; S A M) を用いて、患者血清中に存在する抗原を検出する。

40

【0026】

好適な方法では、検体に R M 2 抗原と特異的に結合する部分を接触させ、次いで、当該部分の R M 2 抗原への特異的結合を検出することによって抗原の有無を検出する。R M 2 抗原と特異的に反応する部分の例は、R M 2 抗原に特異的に結合する抗体である。

【0027】

本発明の意味においては、抗体は、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体、一本鎖抗体、抗体断片 (F v、F a b、F (a b')₂ 等)、キメラ抗体、リサーフェスド (resurfaced) 抗体、ヒト化抗体などを含むものと解する。

【0028】

R M 2 抗原に対するポリクローナル抗体は、当業者であれば、多種多様な温血動物 (ウ

50

マ、ウシ、各種家禽、ウサギ、マウス、ハムスター、ラット等)から容易に生成可能である。例えば、哺乳動物(マウス、ハムスター、ウサギ等)を、抗体応答を当該哺乳動物に惹起する免疫原性を有する形態のRM2抗原で免疫することができる。免疫化の進行は、血漿または血清中の抗体価を検出することで監視可能である。免疫化の後、抗血清を取得し、ポリクローナル抗体を血清から単離することができる。

【0029】

本発明の方法では、好ましくはモノクローナル抗体を使用する。RM2抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体は、従来慣用の技術を利用すれば容易に生成可能である。例えば、KohlerおよびMilstein(1975)によって最初に開発されたハイブリドーマ法(Nature 256, 495-497)によってモノクローナル抗体を産生することができる(米国特許第RE32,011号、米国特許第4,902,614号、米国特許第4,543,439号、米国特許第4,411,993号(いずれも引用により本明細書に含まれるものとする)も参照されたい。さらに、Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, Kennett, McKeam, and Bechtol(監修), 1980およびAntibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane(監修), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988も参照されたい)。その他の技術を利用してモノクローナル抗体を構築することも可能である(例えば、William D. Huse et al., 1989 "Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda," Science 246:1275-1281, L. Sastry et al., 1989 "Cloning of the Immunological Repertoire in Escherichia coli for Generation of Monoclonal Catalytic Antibodies: Construction of a Heavy Chain Variable Region-Specific cDNA Library," Proc Natl. Acad. Sci. USA 86:5728-5732; Kozbor et al., 1983 Immunol. Today 4, 72 re the human B-cell hybridoma technique; Cole et al. 1985 Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy, Allen R. Bliss, Inc., pp. 77-96 re the EBV-hybridoma technique to produce human monoclonal antibodiesを参照されたい。また、Michelle Alting-Mees et al., 1990 "Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas," Strategies in Molecular Biology 3:1-9も参照されたい)。RM2抗原と特異的に反応する抗体の産生についてハイブリドーマ細胞を免疫化学的にスクリーニングし、モノクローナル抗体を単離することができる。

10

20

【0030】

本明細書中、用語「抗体」とは、RM2抗原と特異的に反応する抗体断片を含むものとする。従来慣用の技術を用いて抗体を断片化し、完全な抗体について上述したのと同様の方法で有用性について断片をスクリーニングすることができる。例えば、抗体をペプシンで処理してF(ab')₂断片を生成することができる。得られたF(ab')₂断片を処理してジスルフィド架橋を還元すれば、Fab'断片を産生することができる。

30

【0031】

一本鎖抗体は、可変重鎖および可変軽鎖をリンカーで繋ぐことで産生可能である(例えば、Huston et al. 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5879-5883およびBird et al. 1988 Science, 242, 423-426(いずれも引用により本明細書に含まれるものとする)を参照されたい)。

40

【0032】

本発明は、キメラ抗体誘導體、即ち、ヒト以外の動物の可変領域とヒトの定常領域とを組み合わせた抗体分子も意図する。キメラ抗体分子としては、例えば、マウス、ラットまたはその他の種の抗体に由来する抗原結合ドメインとヒト定常領域とを組み合わせるなどを挙げることができる。キメラ抗体を作製する多種多様の方法が現在までに記載されており、これらの方法を用いて、選択した抗原を分化細胞または腫瘍細胞の表面上で認識する免疫グロブリン可変領域を含有するキメラ抗体を作製することができる。例えば、Morrison et al., 1985; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 6851; Takeda et al., 1985, Nature 314, 452; Cabilly et al., 米国特許第4,816,567号; Boss et al., 米国特許第4,816,397号; Tanaguchi et al., 欧州特許公開第EP171496

50

号；欧州特許公開第 0 1 7 3 4 9 4 号、英国特許第 G B 2 1 7 7 0 9 6 B 号を参照されたい。

【 0 0 3 3 】

本発明はさらに、リサーフェスドモノクローナル抗体の使用も意図する。抗体をリサーフェスドさせる方法は文献に記載されており、例えば、米国特許第 5, 6 3 9, 6 4 1 号（引用により本明細書に含まれるものとする）を参照されたい。

【 0 0 3 4 】

ヒト化抗体も本発明の方法で使用可能である。抗体をヒト化する方法は当該技術分野で周知であり、文献にも記載されている（例えば、Padlan, E. et al. 1991 Molecular Immunology, vol. 28, pp. 489-498、米国特許公開第 2 0 0 2 . 0 0 3 4 7 6 5 A 1 号、米国特許公開第 2 0 0 4 / 0 0 5 8 4 1 4 A 1 号）。

10

【 0 0 3 5 】

従って、本発明の方法での使用に適した抗体としては、ポリクローナル抗体、一本鎖ポリクローナル抗体、ポリクローナル抗体断片、モノクローナル抗体、一本鎖モノクローナル抗体、モノクローナル抗体断片、キメラ抗体、一本鎖キメラ抗体、キメラ抗体断片、リサーフェスド抗体、リサーフェスド一本鎖抗体、リサーフェスド抗体断片、ヒト化抗体、ヒト化一本鎖抗体、ヒト化抗体断片などが挙げられる。

【 0 0 3 6 】

本発明での使用に特に好適なのは、R M 2 m A b とその断片である。モノクローナル抗体 R M 2 とその作製方法は、Saito, S., Levery, S.B., Salyan, M.E.K., Goldberg, R.I., and Hakomori, S. 1994 J. Biol. Chem. 269, 5644-5652（引用により本明細書に含まれるものとする）に記載されている。

20

【 0 0 3 7 】

抗体の R M 2 抗原への特異的結合を検出する方法は当該技術分野で周知であり、免疫組織学；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（S D S - P A G E）後のウェスタンブロット分析；当該抗原に結合する一次抗体に対する標識二次抗体；表面プラズモン共鳴（S P R）分光法；原子間力顕微鏡検査法などが挙げられる。

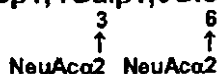
E . 前立腺癌の診断キット 本発明は、また、前立腺癌の診断キットを提供するものであり、当該キットには

(a) 以下に示すエピトープ構造を有する R M 2 抗原に特異的に結合する少なくとも 1 つの部分であって、前立腺癌が疑われる患者から取得した検体に由来する前記部分

30

【 0 0 3 8 】

【 化 4 】



【 0 0 3 9 】

(式中、R は担体を表す)、

40

(b) 当該キットを用いて前立腺癌を診断するための説明書、

(c) 任意に、前記部分の前記抗原への特異的結合によって前記抗原の有無を検出する手段

が含まれる。

【 0 0 4 0 】

適切な担体は上述した担体である。

【 0 0 4 1 】

R M 2 抗原に特異的に結合する適切な部分は、診断方法での使用のところで記載したもののうちいずれでもよい。

【 0 0 4 2 】

50

検出に適した手段は、診断方法のところで記載した手段である。

【0043】

説明書には、診断アッセイに適した検体の種類、例えば診断方法のところで上述したものなどが含まれる。

F. 物質の組成：本発明は、また、RM2抗原を含む単離または精製された前立腺組織サンプルを提供するものである。当該組織サンプルは、当該技術分野で公知の方法で単離および/または精製したものである。スフィンゴ糖脂質抗原および糖タンパク質抗原の単離方法は、Hakomori S & Kannagi R, "Carbohydrate antigens in higher animals", Handbook of Experimental Immunology; Vol. 1: Immunochemistry (Weir DM, Herzenberg LA, Blackwell C, Herzenberg LA監修) 第4版、Blackwell Scientific Publications (オックスフォード、ボストン) 第9章(9.1~9.39頁)に概要が記載されている。先に指摘したように、抗原は糖タンパク質である(Mr~50kDa)。このことは、スフィンゴ糖脂質抗原は糖タンパク質抗原に比べて高レベルには放出されない場合が多いため、重要である。

10

【0044】

組織サンプルは、精製・単離されていなくても、RM2抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体の作製に使用することができ、抗体の作製は当該技術分野で周知の方法で行うことができる。例えば、Saito, S., Levery, S.B., Salyan, M.E.K., Goldberg, R.I., and Hakomori, S. 1994 J. Biol. Chem. 269, 5644-5652(引用により本明細書に含まれるものとする)を参照されたい。

20

【0045】

刊行物および特許出願は全て、個々の刊行物または特許出願を具体的かつ個別に援用する旨記載したように同程度に本明細書中で援用されるものである。本発明を明確にし、かつ、理解する目的で例示および例を挙げていくらか詳細に記載してきたものの、ある一定の変更および改変が添付の特許請求の範囲を超えることなく実施し得ることは明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】図1は、RM2抗原の構造を示す図である。

【図2A-C】図2は、各種グリーソンスコアを有する前立腺癌の生検サンプルにおける、RM2抗原発現の免疫組織学的パターンを示す図である。図A：サンプル1(グリーソンスコア5+4)。図B：サンプル2(グリーソンスコア4+5)。図C：サンプル3(グリーソンスコア5+4)。倍率は200倍。

30

【図2D-F】図2は、各種グリーソンスコアを有する前立腺癌の生検サンプルにおける、RM2抗原発現の免疫組織学的パターンを示す図である。図D：サンプル4(グリーソンスコア3+3)。図E：サンプル5(グリーソンスコア4+3)。図F：サンプル6(グリーソンスコア4+3)。倍率は200倍。

【0047】

正常腺では、陰性またはごく弱いRM2免疫染色が認められた。

【図3】図3は、根治前立腺切除術検体におけるRM2抗原発現の免疫組織学的パターンを示す図である。図A：サンプル1(グリーソンスコア3+4)。図B：サンプル2(グリーソンスコア4+4)。図C：サンプル3(グリーソンスコア4+5)。倍率は200倍。ms：中/強、w：弱、RP：根治前立腺切除術。

40

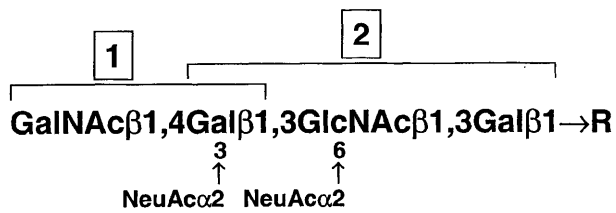
【図4】図4は、根治前立腺切除術検体由来のBPH例(図A)および正常前立腺例(図B)におけるRM2抗原発現の免疫組織学的パターンを示す図である。RM2免疫染色はBPHでは認められず、正常腺ではごく弱いRM2免疫染色が認められた。倍率は100倍。

【図5】図5は、前立腺癌細胞株のRM2によるウェスタンブロット分析を示す図である。図A：RM2による免疫染色。図B：マウスIgMによる免疫染色(陰性対照)。1. PC3(5μg)、2. LNCap(5μg)、3. PC3(10μg)、4. LNCa

50

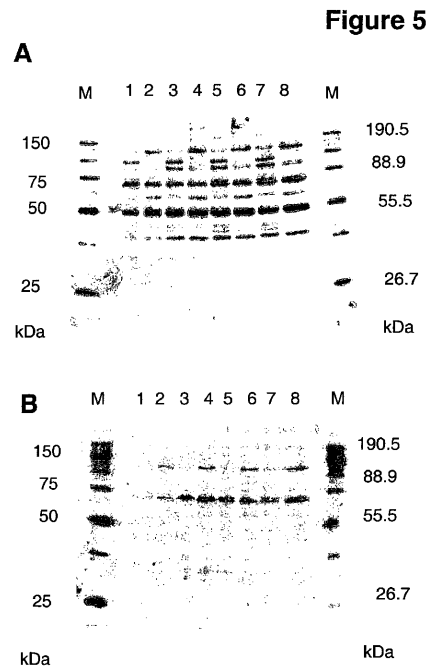
p (1 0 μ g)、 5 . P C 3 (1 5 μ g)、 6 . L N C a p (1 5 μ g)、 7 . P C 3 (2 0 μ g)、 8 . L N C a p (2 0 μ g)、 M : サ イ ズ マ ー カ ー 。 R M 2 は 4 9 k D a の 糖 タ ン パ ク 質 を 主 要 バ ン ド と し て 検 出 し、 他 に も 複 数 の バ ン ド が L N C a p お よ び P C 3 で 検 出 さ れ た。

【 図 1 】



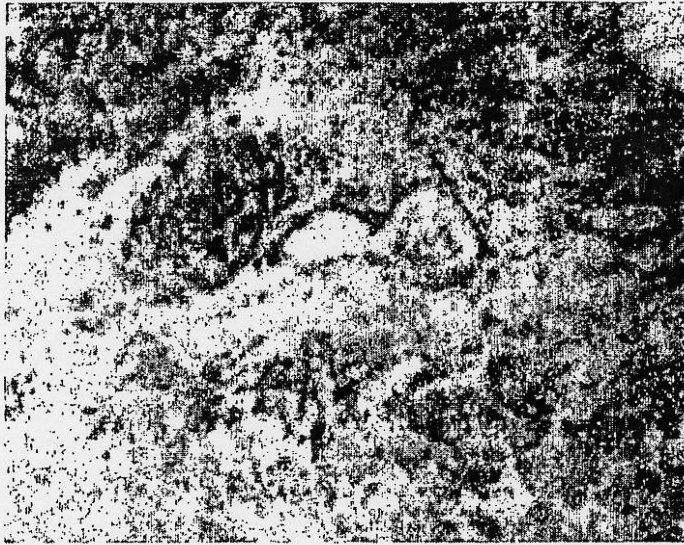
- 1: ガングリオシ리즈構造
- 2: ジシアリルラクトシ리즈 1 型構造

【 図 5 】



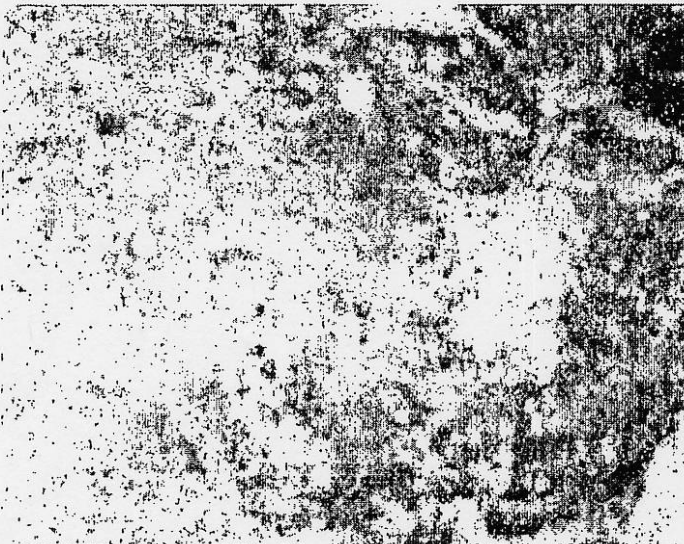
【 図 2 A - C 】

A



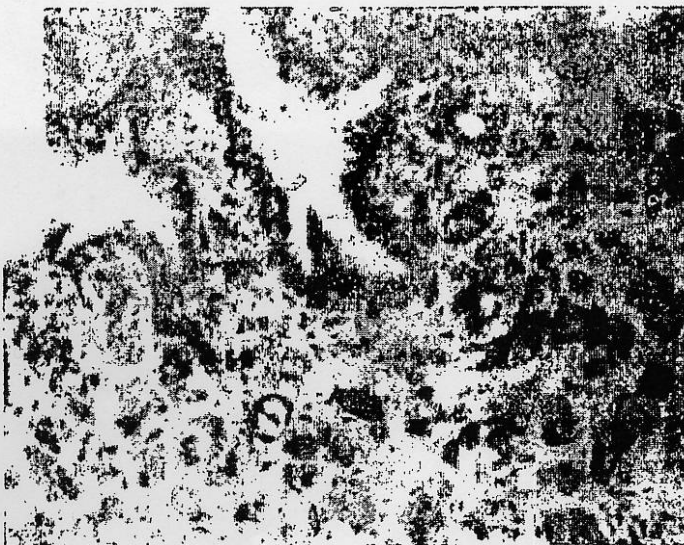
GI 5+4=9
中/強染色
生検 (x200)

B



GI 4+5=9
中/強染色
生検 (x200)

C



GI 5+4=9
中/強染色
生検 (x200)

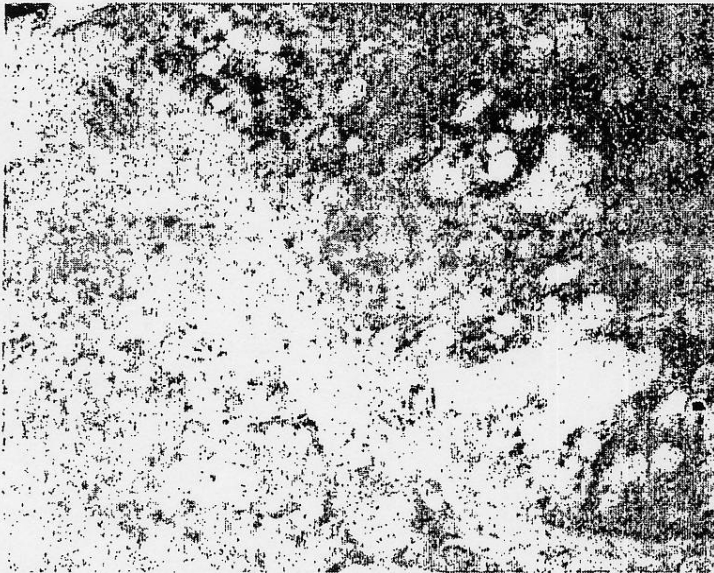
【 図 2 D - F 】

D



**GI 3+3=6,
弱染色
生検 (x200)**

E



**GI 4+3 =7
弱染色
生検 (x200)**

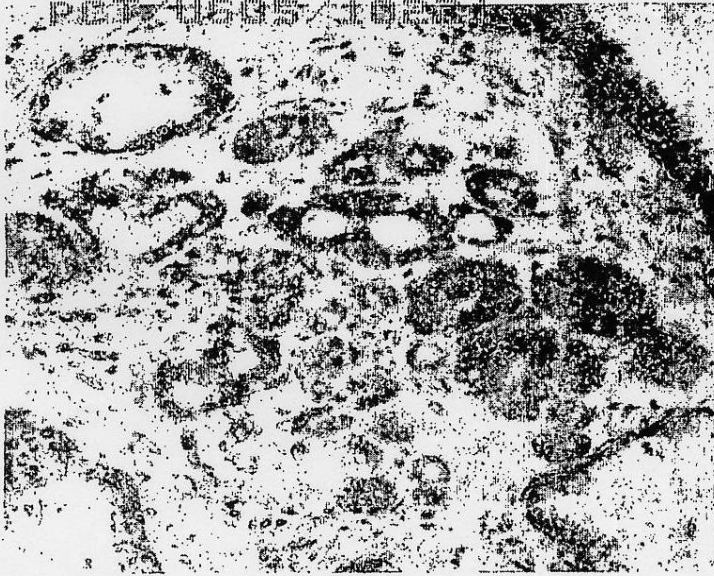
F



**GI 4+3 =7
弱染色
生検 (x200)**

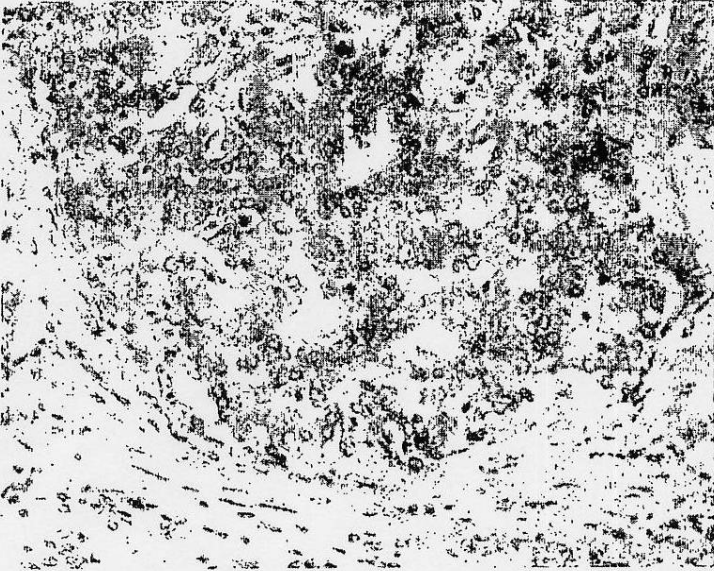
【 図 3 】

A



**GI スコア 3+4=7,
ms-RP(x200)**

B



**GI スコア 4+4=8,
ms-RP(x200)**

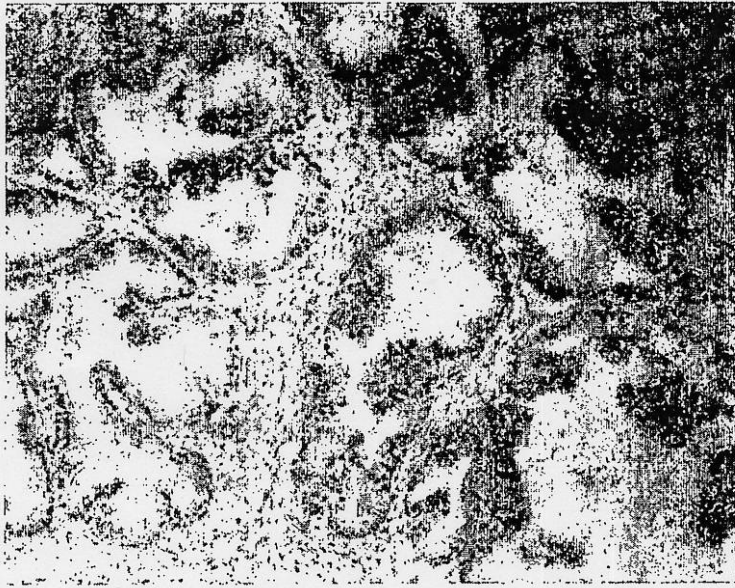
C



**GI スコア 4+5=9,
w-RP(x200)**

【 図 4 】

A



BPH (x100)

B



正常腺 (x100)

【 国際調査報告 】

60700150062



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/10221

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(B): G01N 33/56,33/574(2006.01)		
USPC: 435/7.21,7.23,810		
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) U.S. : 435/7.21, 7.23, 810		
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) CAPLUS, PCTFULL, MEDLINE, DISSAB, WEST (USPTO)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SPECHT et al. American Journal of Phathology 2001, Vol. 158. No. 2, page 419-429, especially, page 420, 2nd column, Tissue samples.	33
Y	SAITO et al. The Journal of Biochemical Chemistry 1999, Vol. 269. No. 8, pages 5644-5652, entire document.	16-32
Y	US 5,168,043 A (CORDON-CARDO et al.) 1 December 1992 (01.12.1992), column 3, line 65 to column 4, line 15, column 4, lines 40-52 and column 18, lines 43-49).	16-32
Y	TANNOCK, I.F. and HILL, R.P. The Basic Science of Oncology, 3rd Ed., New York: McGraw, 1998, page 26, Chapter 3.	28-29
A	ITO et al. The Journal of Biological Chemistry 2001, Vol. 276. No. 20, pages 16695-16703, entire document	1-33
P	SAITO et al. International Journal of Cancer 2005, Vol. 115, pages 105-113, entire document.	1-33
<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:		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"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
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date		"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
"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)		"Z" document member of the same patent family
"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		
Date of the actual completion of the international search 21 September 2006 (21.09.2006)	Date of mailing of the international search report 20 OCT 2006	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201	Authorized officer: Brandon J. Fetterhoff, PhD Telephone No. (571) 272-1600	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

13. 3. 2007

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100106080

弁理士 山口 晶子

(72)発明者 ハコモリ, センイチロウ

アメリカ合衆国ワシントン州98040-2205, マーサー・アイランド, エイティース・アベニュー・サウスイースト 2024

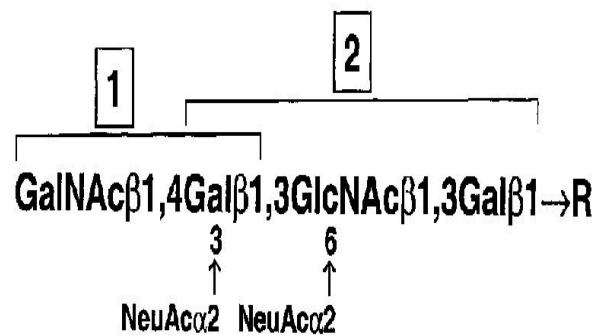
(72)発明者 斎藤 誠一

宮城県仙台市青葉区立町18-12-601

专利名称(译)	RM2抗原 (β 1,4-GalNAc-disialyl-Lc4) 作为前列腺癌 -		
公开(公告)号	JP2007530977A	公开(公告)日	2007-11-01
申请号	JP2007506408	申请日	2005-03-25
[标]申请(专利权)人(译)	推进北部%用于SCI & TECH		
申请(专利权)人(译)	基金会北海道振兴院科技		
[标]发明人	ハコモリセンイチロウ 斎藤誠一		
发明人	ハコモリ,センイチロウ 斎藤 誠一		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 G01N33/567		
CPC分类号	G01N33/57434 G01N33/5308 G01N2400/00		
FI分类号	G01N33/574.B		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫 山口明子		
优先权	10/812357 2004-03-30 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

由单克隆抗体RM2定义的新型碳水化合物抗原 β 1,4-GalNAc-二烯丙基-Lc4在人前列腺癌中表达，但是是良性前列腺增生 (BPH) 或正常的它不在前列腺中表达。单克隆抗体RM2或具有相似特异性的其他抗体可用于通过活组织检查样品，全前列腺切除术标本，患者血清中包含的RM2抗原的定量的免疫组织学来诊断前列腺癌。 [选图]图1



1: ganglio-series structure

2: disialyl lacto-series type 1 structure