

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-89354

(P2005-89354A)

(43) 公開日 平成17年4月7日(2005.4.7)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18	C07K 16/18 ZNA	2G045
A61K 39/395	A61K 39/395 E	4B024
A61P 35/00	A61K 39/395 T	4B064
C12N 5/10	A61P 35/00	4B065
C12N 15/02	GO1N 33/15 Z	4C085
	審査請求 未請求 請求項の数 16 O L	(全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-323624 (P2003-323624)	(71) 出願人	000001029 協和醗酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
(22) 出願日	平成15年9月16日 (2003.9.16)	(71) 出願人	590001452 国立がんセンター総長 東京都中央区築地5丁目1番1号
		(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100101904 弁理士 島村 直己
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リン酸化されたβカテニンを選択的に認識する抗体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 癌の発生、浸潤または転移を診断するための診断剤、および癌の発生、浸潤、転移または増殖を抑制するための治療剤を提供する。

【解決手段】 特定のアミノ酸配列における86位または254位チロシン残基がリン酸化されたカテニンを選択的に認識する抗体またはその免疫反応性断片、およびそれらを有効成分とする癌の発生、浸潤または転移を診断するための診断剤、および癌の発生、浸潤、転移または増殖を抑制するための治療剤に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 で表されるアミノ酸配列における 86 位または 254 位のチロシン残基がリン酸化された カテニンを選択的に認識する抗体。

【請求項 2】

抗体がモノクローナル抗体である請求項 1 記載の抗体。

【請求項 3】

抗体がハイブリドーマ KM2853 または KM2891 から生産される請求項 2 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 4】

IgG クラスの抗体である請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体の免疫反応性断片。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体の誘導体。

【請求項 7】

配列番号 1 で表されるアミノ酸配列における 86 位チロシン残基がリン酸化された カテニンを選択的に認識するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ。

【請求項 8】

配列番号 1 で表されるアミノ酸配列における 254 位チロシン残基がリン酸化された カテニンを選択的に認識するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ。

【請求項 9】

ハイブリドーマが受託番号 FERM BP-8262 で特定される請求項 7 記載のハイブリドーマ。

【請求項 10】

ハイブリドーマが受託番号 FERM BP-8261 で特定される請求項 8 記載のハイブリドーマ。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体、その免疫反応性断片または誘導体を含有する、癌の治療剤。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体、その免疫反応性断片または誘導体を含有する、癌の診断剤。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体、その免疫反応性断片または誘導体を用いてカテニンのチロシンリン酸化を免疫学的測定法によって検出する方法。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体、その免疫反応性断片または誘導体を用いて癌を判別する方法。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体、その免疫反応性断片または誘導体を用いて、配列番号 1 のアミノ酸配列で表される カテニンの 86 位または 254 位のチロシン残基のリン酸化を阻害する薬剤をスクリーニングする方法。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体、その免疫反応性断片または誘導体を用いて癌の治療剤をスクリーニングする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列における 86 位チロシン残基がリン酸化された カテニンを選択的に認識する抗体、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列における 254 位チロシン残基がリン酸化された カテニンを選択的に認識する抗体、およびそれ

10

20

30

40

50

らの利用法に関する。

【背景技術】

【0002】

上皮細胞間の細胞接着は、アドヘレンスジャンクションを構成するカルシウム依存性細胞接着因子であるEカドヘリンのホモフィリックな結合により維持されている。カテニンは、Eカドヘリンの細胞内ドメインに結合する蛋白質の一つとして見出された。また、Eカドヘリンと結合したカテニンは、カテニンを介してアクチン細胞骨格と結合する。即ち、カテニンおよびカテニンは、Eカドヘリンとアクチン細胞骨格との結合を介在している。また、細胞内ドメインを欠損したEカドヘリンは、細胞間接着能を喪失することから、カテニンおよびカテニンを介したEカドヘリンとアクチン細胞骨格との結合は、細胞間接着の維持に必須であると考えられている（非特許文献1）。

10

【0003】

癌の浸潤および癌の転移の第一段階は、癌胞巣からの癌細胞の遊走である。Eカドヘリン細胞間接着機構は、この癌細胞の遊走に関与し、癌の浸潤および癌の転移を抑制する機能を担っていると考えられる。実際、癌細胞では様々な要因によりEカドヘリン細胞間接着機構が不活性化していることが知られている。例えば、Eカドヘリンまたはカテニンの遺伝子の欠失または変異の導入が挙げられる。または、遺伝子のコード領域が正常であってもプロモーター領域のCpGメチル化により引き起こされる、細胞間接着機構に関わる蛋白質の発現低下が挙げられる。

【0004】

また、細胞間の接着性が乏しいびまん浸潤の組織像を示す低分化型腺癌では、Eカドヘリンおよびカテニンの遺伝子異常または発現異常が、高頻度で認められる。このようなEカドヘリンおよびカテニンの遺伝子発現異常による細胞間接着機構の不活性化は、癌の浸潤および転移の引き金の一つになっている。

20

【0005】

一方、細胞間接着を維持した組織像を示す高分化型腺癌では、Eカドヘリンおよびカテニンの遺伝子異常または発現異常の頻度は低い。高分化型腺癌では、腫瘍先進部でのみ細胞間の接着性が喪失し、癌細胞は間質増生を伴って浸潤する病理組織学的所見を認める。また、同一症例の肝転移巣では細胞間の接着能は回復しており、高分化型腺癌においては、Eカドヘリン細胞間接着機構は可逆的に制御されている。

30

【0006】

細胞株を用いた *in vitro* の実験では、細胞内のリン酸化の亢進により、細胞間接着が解離することが確認された。さらに上皮増殖因子（Epidermal Growth Factor；以下、EGFと表記する）や肝細胞増殖因子（Hepatocyte Growth Factor；以下、HGFと表記する）などの増殖因子による刺激があると、細胞間接着は解離する。加えて、EGF受容体であるc-erbB-2のリン酸化触媒ドメインが、細胞内でカテニンと会合していることが見出された。現在では、種々の増殖因子受容体のチロシンリン酸化作用によりカテニンがリン酸化されることが、Eカドヘリン細胞間接着機構が不活性化する一因となっていると考えられている（非特許文献2）。

【0007】

胃の未分化型腺癌の免疫組織染色において、細胞内のリン酸化チロシン量とリン酸化触媒ドメインを有する角質細胞増殖因子（Keratinocyte Growth Factor；KGF）受容体の発現量が相関（ $P < 0.001$ ）すること、および細胞内リン酸化チロシン量と、Eカドヘリンおよびカテニンの細胞質内発現量が相関すること（ $P < 0.05$ ）が報告されている（非特許文献3）。臨床検体の癌部位の抽出物を抗カテニン抗体で免疫沈降した後、抗リン酸化チロシン抗体で検出したところ、リン酸化されたカテニンが検出された。即ち、癌組織内にはリン酸化されたカテニンが著量存在している。一方、癌部位に近接する非癌部位においてはリン酸化されたカテニンは検出されなかった。従って、臨床においても、カテニンのリン酸化を伴う細胞間接着機構の不活性化が、癌の浸潤および癌の転移に関与しているものと考えられる。

40

50

【0008】

リン酸化触媒ドメインを有するerbB-2レセプターとは結合できるが、Eカドヘリンとは結合できない。カテニンのN末端欠失体をコードする遺伝子を導入したヒト胃癌細胞株TMK-1細胞の形質転換体を、ヌードマウスの腹腔内に移植し、腹膜への転移が検討された。遺伝子導入されていないTMK-1細胞と比較した場合、カテニンN末端欠失体の形質転換体には腹膜への転移の抑制効果が認められた(非特許文献4)。即ち、カテニンN末端欠失体の形質転換体では、受容体erbB-2による野生型カテニンのチロシンリン酸化を、カテニンN末端の欠失体が競合的に阻害することで、Eカドヘリンによる細胞間接着機構を正常化し、癌細胞の転移を抑制していると考えられた。

【0009】

また、カテニンはwntシグナルを伝達して核内で転写活性化因子として機能しているとの報告がある(非特許文献5)。カテニンは、グリコーゲン合成酵素キナーゼ-3(以下、GSK-3と表記する)によるリン酸化、癌抑制遺伝子であるAPC遺伝子の産物やその他の因子との結合、ユビキチン化を経て、分解されることで細胞質内での存在量が低く保たれている。wntとその受容体であるFrizzledの結合により、GSK-3は不活性化され、カテニンはリン酸化されずに分解機構から免れて細胞質内に蓄積する。蓄積したカテニンは、転写因子であるリンパ球エンハンサー結合因子-1(lymphoid enhancer binding factor-1; 以下、LEF1と表記する)またはT細胞因子-4(T cell factor-4; 以下、TCF4と表記する)などと結合して、核内に移行して、c-myc、Cyclin D、PPAR(peroxisome proliferator activated receptor)等の癌関連遺伝子の転写活性化を行うと考えられている。

【0010】

また、多くの大腸癌において、カテニンの分解に関与すると考えられているAPC遺伝子の欠失または変異が見出されており、同様に多くの癌において、カテニンがGSK-3によりリン酸化を受ける部位に変異が認められる。即ち、カテニンの細胞質内での蓄積は、癌の発生や増殖に深く関わっていると考えられる。

【0011】

さらに、APC遺伝子またはカテニン遺伝子の変異が原因でカテニンの分解系が不完全になっているメラノーマ細胞株に、EGF受容体erbB-2の分解を誘導する薬剤であるゲルダマイシンを作用させると、カテニンのチロシン残基のリン酸化は抑制され、カテニンとEカドヘリンとの結合が亢進されると同時に、核内カテニン量の低下とカテニン依存的な転写活性化因子の活性低下が認められる(非特許文献6)。即ち、カテニンの分解系が不全となった癌細胞では、増殖因子受容体のリン酸化触媒ドメインによるカテニンのチロシンリン酸化は、Eカドヘリンの細胞間接着機構を不活性化して癌の浸潤および癌の転移を引き起こすと同時に、wntシグナル伝達系の正の制御を介して、癌の発生および癌の増殖にも関与している可能性が示唆された。

【0012】

カテニンのリン酸化によるEカドヘリン細胞間接着機構不活性化の分子レベルでのメカニズムは未だ明らかにされていないが、いくつかの仮説が提唱されている。リン酸化されたカテニンは、Eカドヘリンに対する親和性が低下し、Eカドヘリンとの結合が解離する。*in vitro*の組換え体蛋白質を用いた実験で、癌原遺伝子であるc-Src遺伝子の産物によるカテニンのリン酸化部位は、86位チロシンまたは654位チロシンであり、チロシンをフェニルアラニンに置換した変異体を用いた検討から、カテニンとEカドヘリンとの親和性の低下には654位チロシンのリン酸化が関与していることが明らかとなった(非特許文献7)。

【0013】

リンパ腫細胞株K562細胞にEカドヘリン遺伝子を導入して細胞間接着機構が導入された形質転換体に、チロシンフォスファターゼの阻害剤を作用させて細胞内リン酸化を亢進させると、細胞の凝集塊が解離する。その際、Eカドヘリンとカテニンの結合は解離せず、カテニンとカテニンの結合が解離する。さらにK562細胞にEカドヘリンとカテニ

10

20

30

40

50

ンとのキメラ遺伝子を導入した形質転換体は、チロシンフォスファターゼ阻害剤により細胞の凝集塊の解離は認められなかった。従って、Eカドヘリンとカテニンおよびカテニンの複合体から、カテニンが離脱することが、細胞間接着機構の不活性化の原因であることが示唆された。(非特許文献8)。

【0014】

このように、カテニンのリン酸化は、癌の発生、浸潤、転移、ならびに増殖に深く関わっていると考えられるが、これらの現象において重要なカテニンのチロシンリン酸化部位はこれまでに特定されていない。

【0015】

このようなリン酸化アミノ酸残基を特異的に検出する場合には、一般的にリン酸化アミノ酸残基を含むペプチドと特異的に反応する抗体が利用される。これまでに、リン酸化カテニンと特異的に反応する抗体としては、ウサギ抗リン酸化カテニンポリクローナル抗体が市販されている。該抗体は41位のチロシンおよび45位のセリンがリン酸化されたカテニン、または33位、37位のセリンおよび41位のチロシンがリン酸化されたカテニンを認識する。しかしながら、特定のリン酸化部位を認識できる抗カテニンモノクローナル抗体の報告はない。さらに、ただ一つのリン酸化部位を認識する抗リン酸化カテニンモノクローナル抗体は知られておらず、特に86位リン酸化チロシンまたは254位リン酸化チロシンを選択的に認識できる抗リン酸化カテニン抗体は知られていない。

10

【0016】

20

【非特許文献1】EMBO Journal, 7, 3679, 1988

【非特許文献2】Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy, 26, 565, 1999

【非特許文献3】Japanese Journal of Cancer Research, 89, 829, 1998

【非特許文献4】Oncogene, 13, 883, 1996

【非特許文献5】細胞工学, 16, 793, 1997

【非特許文献6】Cancer Research, 61, 1671, 2001

【非特許文献7】Journal of Biological Chemistry, 274, 36734, 1999

【非特許文献8】The Journal of Cell Biology, 127, 1375, 1994

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0017】

本発明の目的は、癌を診断するための診断剤、癌の治療剤、ならびに癌の治療剤をスクリーニングする方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明は、以下に示す(1)~(16)に関する。

(1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列における86位または254位のチロシン残基がリン酸化されたカテニンを選択的に認識する抗体。

(2) 抗体がモノクローナル抗体である(1)記載の抗体。

(3) 抗体がハイブリドーマKM2853またはKM2891から生産される(2)記載のモノクローナル抗体。

40

(4) IgGクラスの抗体である(1)~(3)のいずれかに記載の抗体。

(5) (1)~(4)のいずれかに記載の抗体の免疫反応性断片。

(6) (1)~(4)のいずれかに記載の抗体の誘導体。

(7) 配列番号1で表されるアミノ酸配列における86位チロシン残基がリン酸化されたカテニンを選択的に認識するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ。

(8) 配列番号1で表されるアミノ酸配列における254位チロシン残基がリン酸化されたカテニンを選択的に認識するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ。

(9) ハイブリドーマが受託番号FERM BP-8262で特定される(7)記載のハイブリドーマ。

50

(10) ハイブリドーマが受託番号FERM BP-8261で特定される(8)記載のハイブリドーマ。

(11)(1)~(4)のいずれかに記載の抗体、その免疫反応性断片または誘導体を含有する、癌の治療剤。

(12)(1)~(4)のいずれかに記載の抗体、その免疫反応性断片または誘導体を含有する、癌の診断剤。

(13)(1)~(4)のいずれかに記載の抗体、その免疫反応性断片または誘導体を用いてカテニンのチロシンリン酸化を免疫学的測定法によって検出する方法。

(14)(1)~(4)のいずれかに記載の抗体、その免疫反応性断片または誘導体を用いて癌を判別する方法。

(15)(1)~(4)のいずれかに記載の抗体、その免疫反応性断片または誘導体を用いて、配列番号1のアミノ酸配列で表されるカテニンの86位または254位のチロシン残基のリン酸化を阻害する薬剤をスクリーニングする方法。

(16)(1)~(4)のいずれかに記載の抗体、その免疫反応性断片または誘導体を用いて癌の治療剤をスクリーニングする方法。

【発明の効果】

【0019】

本発明は、配列番号1で表されるアミノ酸配列における86位チロシン残基がリン酸化されたカテニンまたは配列番号1で表されるアミノ酸配列における254位チロシン残基がリン酸化されたカテニンを選択的に認識する抗体およびその用途を提供する。また、本発明の抗体は、配列番号1のアミノ酸配列で表されるカテニンの86位または254位のチロシンリン酸化を特異的に認識することができるため、配列番号1のアミノ酸配列で表されるカテニンの86位または254位のチロシンリン酸化を阻害する物質のスクリーニングにも利用することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

本発明の抗体

本発明の配列番号1で表されるアミノ酸配列における86位または254位のチロシン残基がリン酸化されたカテニンを選択的に認識する抗体には、配列番号1で表されるカテニンのアミノ酸配列において、86位チロシンがリン酸化されたカテニンを選択的に認識する抗体(以下、「86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体」と表記する)、および254位チロシンがリン酸化されたカテニンを選択的に認識する抗体(以下、「254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体」と表記する)が含まれる。

【0021】

86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体は、配列番号1で表されるアミノ酸配列における86位チロシン残基がリン酸化されたカテニンに特異的に結合できる抗体をいう。254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体は、配列番号1で表されるアミノ酸配列における254位チロシン残基がリン酸化されたカテニンに特異的に結合できる抗体をいう。

【0022】

ここで、配列番号1で表されるアミノ酸配列における86位チロシン残基がリン酸化されたカテニンに特異的に結合できる抗体とは、カテニンのアミノ酸配列中の86位チロシン残基がリン酸化されていないカテニンよりも86位チロシン残基がリン酸化されているカテニンに対し、より強いアフィニティーをもって特異的に結合する抗体をいう。

【0023】

本発明の抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれも包含されるが、モノクローナル抗体が好ましい。

【0024】

ポリクローナル抗体としては、免疫を施された動物の抗血清、および該抗血清から精製

10

20

30

40

50

されたポリクローナル抗体を挙げることができる。

【0025】

モノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより生産された抗体および抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した形質転換体により生産される遺伝子組換え抗体を挙げることができる。

【0026】

遺伝子組換え抗体には、ヒト化抗体およびヒト抗体など、遺伝子組換えにより製造される抗体が包含される。遺伝子組換え抗体としては、モノクローナル抗体の有する性質と同等の性質を有し、ヒト体内において抗原性が低下し、血中半減期が延長されたものが好ましく用いられる。モノクローナル抗体の有する性質と同等の性質としては結合活性、中和活性などが挙げられる。

10

【0027】

ヒト化抗体は、ヒト型キメラ抗体およびヒト型相補性決定領域 (complementary determining region; 以下、CDRと表記する) 移植抗体を包含する。

【0028】

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体の重鎖 (以下、H鎖と表記する) V領域 (以下、抗体重鎖可変領域をVHと表記する) および軽鎖 (以下、L鎖と表記する) V領域 (以下、抗体L鎖可変領域をVLと表記する) と、ヒト抗体の重鎖定常領域 (以下、CHと表記する) およびヒト抗体の軽鎖定常領域 (以下、CLと表記する) とからなる抗体をいう。

【0029】

本発明において、ヒト型キメラ抗体は、配列番号1で表されるアミノ酸配列における86位チロシン残基または254位チロシン残基がリン酸化されたカテニンに特異的に結合するマウスモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマから、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体CHおよびヒト抗体CLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターに挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、これを動物細胞へ導入して発現させることにより製造できる。

20

【0030】

本発明のヒト型キメラ抗体のC領域の構造としては、いずれのイムノグロブリン (Ig) クラスに属するものでもよいが、IgG型、さらにはIgG型に属するIgG1、IgG2、IgG3、IgG4等のイムノグロブリンのC領域が好ましい。

30

【0031】

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDR配列で任意のヒト抗体のVH配列およびVL配列をそれぞれ置換したV領域をコードする遺伝子を構築し、ヒト抗体のCHおよびヒト抗体のCLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ導入し、発現させることにより製造することができる。

【0032】

本発明のヒト型CDR移植抗体のC領域の構造としては、いずれのイムノグロブリン (Ig) クラスに属するものでもよいが、IgG型、さらにはIgG型に属するIgG1、IgG2、IgG3、IgG4等のイムノグロブリンのC領域が好ましい。

【0033】

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体を意味するが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリー、およびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体等も包含する。

40

【0034】

ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト抗体を産生するヒト末梢血リンパ球を単離し、EBウイルスなどを感染させて不死化、単一クローン化することにより、該抗体を産生するリンパ球を培養し、培養物中より該抗体を精製して製造することができる。

【0035】

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞などのヒト抗体産生細胞から調製した抗体cDNAをファージベクター中に挿入することにより、Fab、scFv等の抗体断片をファージ

50

表面に発現させたライブラリーのことをいう。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、さらに遺伝子工学的手法を用いて、2本の完全なH鎖および2本の完全なL鎖からなるヒト抗体分子に変換することも可能である。

【0036】

ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子がゲノム内に組み込まれた動物をいう。具体的には、マウス等のES細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ES細胞を他のマウス初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック動物を創製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製は、通常のヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを取得し、これを培養して培養物中の該抗体を精製することにより実施できる。

【0037】

抗体の免疫反応性断片

本発明の抗体の免疫反応性断片は、上記のような本発明の抗体の断片であって、配列番号1で表されるアミノ酸配列における86位チロシン残基がリン酸化されたカテニンまたは配列番号1で表されるアミノ酸配列における254位チロシン残基がリン酸化されたカテニンに特異的に結合することができる抗体断片をいう。このような免疫反応性断片は、本発明の抗体を適当なペプチダーゼで消化して得られる抗体断片、組換えDNA技術を用いて作製される抗体断片を包含する。本発明の免疫反応性断片には、上記の本発明の抗体のFab (Fragment of antigen binding)、 $F(ab')_2$ 、Fab'、一本鎖抗体 (Single chain Fv; 以下、scFvと称す) [Science, 242, 423, 1988]、2量体化可変領域 (以下、Dibodyと称す) [Nature Biotechnol., 15, 629, 1997]、およびジスルフィド安定化V領域断片 (disulfide stabilized Fv; 以下、dsFvと称す) [Molecular Immunol., 32, 249, 1995] が包含される。また、本発明の抗体断片には、抗体重鎖V領域 (VH)、および抗体軽鎖V領域 (VL) のCDRのアミノ酸配列を含むペプチド (以下、CDRを含むペプチドと表記する) [J. Biol. Chem., 271, 2966, 1996] も包含される。

【0038】

Fabは、IgGのヒンジ領域で2本のH鎖を架橋している2つのジスルフィド結合の上部のペプチド部分を酵素パピインで切断して得られるH鎖のN末端側半分と、L鎖全体で構成される分子量約3万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0039】

本発明のFabは、86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体または254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体を酵素パピインで処理して取得することができる。または、該抗体のFab断片をコードするDNAを原核生物発現ベクターまたは真核生物発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物または真核生物に導入することにより発現させ、Fabを製造することができる。

【0040】

$F(ab')_2$ は、IgGのヒンジ領域の2対のジスルフィド結合の下部を酵素トリプシンで処理して得ることができる、2つのFab領域がヒンジ部分で結合した分子量約10万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0041】

本発明の $F(ab')_2$ は、86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体または254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体を酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、該抗体の $F(ab')_2$ 断片をコードするDNAを原核生物発現ベクターまたは真核生物発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物または真核生物に導入することにより発現させ、 $F(ab')_2$ を製造することができる。

【0042】

Fab'は、下記 $F(ab')_2$ のヒンジ間のジスルフィド結合を切断して得られる分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0043】

10

20

30

40

50

本発明のFab'は、86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体のまたは254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体のF(ab')₂を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体のFab'断片をコードするDNAを原核生物発現ベクターまたは真核生物発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物または真核生物に導入することにより発現させ、Fab'を製造することができる。

【0044】

scFvは、一本のVHと一本のVLとが適当なペプチドリンカー（以下、Pと表記する）を用いて連結された、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドとして示される断片をいう。本発明で使用されるscFvに含まれるVHおよびVLとしては、本発明の86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体または254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体のいずれのものも用いることができる。

10

【0045】

本発明のscFvは、86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体または254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体から、VHおよびVLのcDNAを取得してscFv断片をコードするDNAを構築し、原核生物発現ベクターまたは真核生物発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物または真核生物に導入して発現させることにより、製造することができる。

【0046】

Diabodyは、抗原結合特異性の同じまたは異なるscFvが2量体を形成した抗体断片で、同じ抗原に対する2価の抗原結合活性、または異なる抗原に対する2特異的な抗原結合活性を有する抗体断片である。

20

【0047】

本発明のDiabodyは、86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体または254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体から、VHおよびVLのcDNAを取得してDiabody断片をコードするDNAを構築し、原核生物発現ベクターまたは真核生物発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物または真核生物に導入して発現させることにより製造することができる。

【0048】

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ジスルフィド結合により結合させたものである。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらに示された方法 [Protein Engineering, 7, 697, 1994] に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。

30

【0049】

本発明のdsFvに含まれるVHおよびVLは、86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体、または254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体のいずれのものも用いることができる。

【0050】

本発明のdsFvは、86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体または254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体から、VHおよびVLのcDNAを取得してdsFv断片をコードするDNAを構築し、原核生物発現ベクターまたは真核生物発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物または真核生物に導入して発現させることにより、製造することができる。

40

【0051】

CDRを含むペプチドは、VHまたはVLのCDRの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のCDRを含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることによって製造することができる。

【0052】

本発明のCDRを含むペプチドは、86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体または254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体から、VHおよびVLのcDNAを取得してCDRを含むペプチドをコードするDNAを構築し、原核生物発現ベクターまたは真核生物発現

50

ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物または真核生物に導入して発現させることにより、製造することができる。また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法（フルオレメチルオキシカルボニル法）、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製造することもできる。

【0053】

抗体誘導体

本発明の抗体の誘導体としては、86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体もしくはその免疫反応性断片、または254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体もしくはその免疫反応性断片に、放射性同位元素、蛋白質または薬剤などを化学的にまたは遺伝子工学的に結合させた抗体の誘導体が挙げられる。

10

【0054】

本発明の抗体の誘導体は、本発明の86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体もしくはその免疫反応性断片、または254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体もしくはその免疫反応性断片のH鎖またはL鎖の、N末端側またはC末端側、抗体または抗体断片中の適当な置換基または側鎖、あるいは抗体または抗体断片中の糖鎖に、放射性同位元素、蛋白質または薬剤（好ましくは、低分子薬剤）などを化学的手法〔抗体工学入門、金光修著、（株）地人書館、1994〕を用いて結合させることにより製造することができる。

【0055】

あるいは、86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体もしくは254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体またはその免疫反応性断片をコードするDNAと、結合させたい蛋白質をコードするDNAとを連結させたDNAを、原核生物発現ベクターまたは真核生物発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物または真核生物に導入することにより発現させて製造することができる。

20

【0056】

放射性同位元素としては、 ^{131}I 、 ^{125}I などがあげられ、例えば、クロラミンT法などにより抗体に結合させることができる。

【0057】

薬剤としては、ナイトロジェン・マスタード、サイクロフォスファミドなどのアルキル化剤、5-フルオロウラシル、メソトレキセートなどの代謝拮抗剤、ダウノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシンC、ダウノルピシン、ドキシソルピシンなどの抗生物質、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピンデシンのような植物アルカロイド、タモキシフェン、デキサメタゾンなどのホルモン剤などの抗癌剤〔臨床腫瘍学、日本臨床腫瘍研究会編、癌と化学療法社、1996〕、またはヒドロコチゾン、プレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン、インドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート、ペニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド、アザチオプリンなどの免疫抑制剤、マレイン酸クロルフェニラミン、クレマスチンのような抗ヒスタミン剤などの抗炎症剤〔炎症と抗炎症療法、医歯薬出版株式会社、1982〕などが挙げられる。例えば、ダウノマイシンと抗体を結合させる方法としては、グルタルアルデヒドを介してダウノマイシンと抗体のアミノ基間を結合させる方法、水溶性カルボジイミドを介してダウノマイシンのアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法などが挙げられる。

30

40

【0058】

蛋白質としては、免疫担当細胞を活性化するサイトカイン、例えば、ヒトインターロイキン2、ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、ヒトマクロファージコロニー刺激因子、ヒトインターロイキン12などが挙げられる。また、癌細胞を直接障害する活性を有するリシンやジフテリア毒素などの毒素を用いることができる。例えば、蛋白質と抗体またはその免疫反応性抗体断片とを結合させた融合抗体については、抗体または抗体断片をコードするcDNAに蛋白質をコードするcDNAを連結させ、融合抗体をコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物または真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより発現させ、融合抗体を製造することができる。

【0059】

50

本発明の抗体またはその免疫反応性断片の、配列番号1で表されるアミノ酸配列における86位のチロシン残基がリン酸化されたカテニンまたは配列番号1で表されるアミノ酸配列における254位のチロシン残基がリン酸化されたカテニンに対する結合活性は、一般的に使用される免疫学的測定法で測定することができる。免疫学的測定法としては、ELISA [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]、およびウェスタンブロッティング [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]などがあげられる。これらの方法により、*in vitro*において測定することができる。

【0060】

以下に、本発明を構成する86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体または254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体、その免疫反応性断片および誘導体の製造法、それらの用途、ならびにそれらを含む薬剤の用途について説明する。

【0061】

1. 86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体または254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体の製造法

(1) 抗原とするペプチドの調製

配列番号1で表されるアミノ酸配列における86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体、または配列番号1で表されるアミノ酸配列における254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体は、カテニンのアミノ酸配列のうちの、それぞれ配列番号1で表されるアミノ酸配列における86位または254位のチロシンを含む連続した5残基以上、具体的には6~30残基、好ましくは10~25残基のアミノ酸配列からなり、配列番号1で表されるアミノ酸配列における86位または254位のチロシンをリン酸化チロシンに置換したペプチドを化学合成し、該ペプチドを抗原として動物に免疫することにより、それぞれ作製することができる。配列番号1で表されるアミノ酸配列における86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体を製造するための抗原ペプチドの具体例としては、配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるペプチド等が挙げられる。配列番号1で表されるアミノ酸配列における86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体を製造するための抗原ペプチドの具体例としては、配列番号5で表されるアミノ酸配列からなるペプチド等が挙げられる。すなわち、本発明の86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体は、86位チロシンリン酸化カテニンにおける上記リン酸化ペプチド部分をエピトープとし、当該リン酸化ペプチド部分に特異的に結合する。254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体も同様に、254位チロシンリン酸化カテニンにおける上記リン酸化ペプチド部分をエピトープとし、当該リン酸化ペプチド部分に特異的に結合する。

【0062】

必要に応じて該ペプチドのN末端またはC末端には、後述する担体蛋白質との結合に用いるためのシステイン残基を付加する。チロシンがリン酸化されたペプチドは、文献の方法 [Helv. Chim. Acta, 74, 1314, 1991; Helv. Chem. Acta, 75, 707, 1992; Tetrahedron Lett., 30, 6229, 1989; Tetrahedron Lett., 29, 3591, 1988] に基づきペプチド合成機等を用いて固相合成を行うことにより化学合成することができる。

【0063】

(2) ポリクローナル抗体の作製

上記のペプチドに対するポリクローナル抗体を含む抗血清は、文献 [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, 1988] (以下、Antibodies: A Laboratory Manualと略記する)等に記載の一般的な方法により、マウス、ラット、ハムスター、ウサギなどの動物の皮下、静脈内または腹腔内に、適当なアジュバントとともに上記抗原を10日から4週間おきに数回投与して免疫を行うことにより調製することができる。免疫は、86位リン酸化チロシンを含む上記ペプチド抗原および254位リン酸化チロシンを含む上記ペプチド抗原の片方で行ってもよく、または双方を含む混合物を用いて行ってもよい。混合物を用いて免疫を行った場合は、86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体と254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体を含むポリクローナル抗体が得

られる。

【0064】

(1)で調製したペプチドだけでは抗原として抗体を惹起する力が弱い場合、ペプチドをキーホール・リンペット・ヘモシアニン(Keyhole Limpet Hemocyanine; 以下、KLHと表記する)、ウシ血清アルブミン、オボアルブミン、破傷風毒素などの担体蛋白質に結合させたものを抗原とし、例えばウサギでは200~1000 μ g、マウスで10~100 μ gを1回あたり投与する。ペプチドと担体蛋白質との結合はm-マレイニイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミド(MBS)、グルタルアルデヒドを用いて行うことができる。アジュバンドとしては、フロインドの完全アジュバント(Complete Freund's Adjuvant)または、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなどが挙げられる。各投与後3~10日目に免疫動物の眼底静脈叢または尾静脈より採血し、抗原に用いたリン酸化ペプチドに対する反応性について、酵素免疫測定法で確認し、その血清が十分な抗体価を示した動物から採取した血清を抗血清とする。酵素免疫測定法は、抗原に用いたリン酸化ペプチドをプレートにコートし、サンプルである血清を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質または放射性同位体等で標識した抗イムノグロブリン抗体(免疫に用いた動物のイムノグロブリンに対する抗体)を反応させた後に標識物質に応じた反応を行い、抗原ペプチドを認識して結合する抗体を検出および定量する方法である[酵素免疫測定法(ELISA法): 医学書院刊, 1976]。

10

【0065】

(1)で調製した抗原用のペプチドを、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド(N-hydroxysuccinimide、NHS)により活性化したセファロース-4B(Amersham Pharmacia Biotech社製)やその充填済カラムであるハイトラップNHS-活性化カラム(HiTrap NHS-activated column、Amersham Pharmacia Biotech社製)等に固定化して作製したアフィニティークラムを用いて、上記の抗血清に対してアフィニティークロマトグラフィーを行うことにより、抗原ペプチドと結合するポリクローナル抗体を精製することができる。ペプチドの固定化やアフィニティークロマトグラフィーはメーカーの添付書類に従って行うことができる。

20

【0066】

このようにして精製したポリクローナル抗体には、抗原としたペプチドのアミノ酸配列中のリン酸化チロシン以外の部分をエピトープとするために、抗原としたペプチドまたは、配列番号1で表されるアミノ酸配列における86位もしくは254位のチロシン残基がリン酸化されたカテニン以外の、86位または254位がリン酸化されていないカテニンとも結合できる抗体も含まれている。そこで、(1)で調製した抗原用のペプチドと同一のアミノ酸配列において、チロシンがリン酸化されていないペプチドを上記方法を用いて固定化したアフィニティークラムに、上記で精製したポリクローナル抗体を通塔して、配列番号1で表されるアミノ酸配列における86位または254位がリン酸化されていないカテニンを認識する抗体をカラムに結合させて除くことにより、86位チロシンリン酸化選択的抗カテニンポリクローナル抗体または254位チロシンリン酸化選択的抗カテニンポリクローナル抗体を精製することができる。

30

【0067】

(3)モノクローナル抗体の作製

40

(2)と同様にして3~20週令のマウスまたはラットを免疫し、血清中に十分な抗体価を示した動物の脾臓、リンパ節、末梢血より抗体産生細胞を採取する。例えば脾臓を摘出し、脾細胞を採取する。

【0068】

ハイブリドーマを得るため、抗体産生細胞と骨髄腫細胞との細胞融合を行う。抗体産生細胞と融合させる骨髄腫細胞として、一般に入手可能な株化細胞を使用することができる。骨髄腫細胞としては、例えば、マウスから得られた株化細胞である8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c由来)骨髄腫細胞株P3-X63Ag8-U1(P3-U1)[Kohler G. et al., *Europ. J. Immunol.*, 6, 511, 1976]、SP2/0-Ag14(SP-2/0)[Shulmanet M. et al., *Nature*, 276, 269, 1978]、P3-X63Ag8653(653)[Kearney JF et al., *J. Immunol.*, 123, 15

50

48, 1979]、P3-X63Ag8 (X63) [Kohler G. et al., Nature, 256, 495, 1975] など、イン・ビトロ (*in vitro*) で増殖可能な骨髄腫細胞であればいかなるものでもよい。これらの細胞株の培養および継代については公知の方法 [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, 1988] に従い、細胞融合時まで 2×10^7 個以上の細胞数を確保する。

【0069】

抗体産生細胞と骨髄腫細胞を、最小培地 (minimal essential medium; 以下、MEMと表記する) またはリン酸緩衝化生理食塩水 (Phosphate Buffered Saline; 以下、PBSと表記する) で洗浄したのち、ポリエチレングリコール - 1000などの細胞凝集性媒体を加え、細胞融合させる。融合細胞をHAT培地 [正常培地 (RPMI-1640培地に 1.5 mmol/L グルタミン、 $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 2-メルカプトエタノール、 $10 \mu\text{g/mL}$ ジェンタマイシンおよび10%ウシ胎児血清 (FCS) を加えた培地) に 10^{-4} mol/L ヒポキサンチン、 $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ チミジンおよび $4 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ アミノプテリンを加えた培地] に懸濁させ、96ウェルプレートに分注して培養する。

【0070】

培養後、各ウェルの培養上清の一部をとり酵素免疫測定法により、抗原としたリン酸化ペプチドに、抗原のペプチドと同一の配列を有する非リン酸化ペプチドと比較してより強い反応性を示すものを選択する。選択したウェル内の細胞から、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返し [1回目は、HT培地 (HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2回目は、正常培地を使用する]、安定して強い抗体価の認められたものを86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体または254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

【0071】

精製モノクローナル抗体のサブクラスの設定は、モノクローナル抗体タイピングキットなどを用いて行うことができる。蛋白質量は、ローリー法または波長280nmでの吸光度より算出することができる。

【0072】

精製モノクローナル抗体の取得法としては、プリスタン (Pristane、2、6、10、14-テトラメチルペンタデカン) 0.5 ml を腹腔内投与し、2週間飼育した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに、上記で得られた86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体産生ハイブリドーマ細胞または254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体産生ハイブリドーマ細胞 $5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。該マウスまたはヌードマウスから腹水を採取し、遠心分離、40~50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿法、DEAE-セファロースカラム、プロテインAカラムまたはセルロフィンGSL2000 (生化学工業) のカラムなどを用いて、IgGまたはIgM画分を回収し、精製モノクローナル抗体とする。

【0073】

なお、本発明のハイブリドーマの具体例としては、86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体産生ハイブリドーマKM2891、および254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体産生ハイブリドーマKM2853などが挙げられる。ハイブリドーマKM2853は、平成14年12月19日付けで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 (茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第3) にFERM BP-8261として寄託されている。また、ハイブリドーマKM2891は、平成14年12月19日付けで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 (茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第3) にFERM BP-8262として寄託されている。

【0074】

2. 86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体、または254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体、その免疫反応性断片および誘導体の用途

本発明の86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体または254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体は、カテニンのリン酸化された86位のチロシンまたは2

54位のアミノ酸にそれぞれ特異的に結合することができる。このような性質を有する本発明の抗体は以下の用途に使用することができる。

【0075】

(1)本発明の抗体を用いる カテニンのリン酸化を検出する方法、癌の診断剤および癌を判別する方法

細胞内の カテニンのリン酸化は、上記1で得られた抗体を用いて、免疫学的方法により検出することができる。

【0076】

また、 カテニンの細胞内での上昇は癌に関与しているとされることから、上述の免疫学的方法で カテニンの定量を行うことにより、癌の発生、癌増殖、癌浸潤および癌転移の状態を判別することができる。したがって、本発明の抗体は癌の診断剤として用いることができる。

10

【0077】

具体的には、本発明の抗体を、細胞抽出物または被験試料と接触させて、本発明の抗体と カテニンの結合を定性的または定量的に測定する。以上のことにより、細胞抽出物または被験試料内の カテニンのリン酸化を定量することにより、癌の発生、癌増殖、癌浸潤および癌転移の状態を予測することができる。

【0078】

被験試料としては、特に限定されないが、例えば生体試料、具体的には、癌化の疑われる病変組織など、それらの抽出物等が挙げられ、生検試料、手術摘出組織などを使用するのが好ましい。

20

【0079】

本発明の カテニンのリン酸化の度合いを調べる方法としては、免疫学的測定法が挙げられる。免疫学的測定方法としては、イムノアッセイ法、イムノプロットティング法、凝集反応、補体結合反応、溶血反応、沈降反応、金コロイド法、クロマトグラフィー法、免疫染色法等の抗原抗体反応を利用した方法であればいかなるものも包含されるが、好ましくは、酵素免疫学的測定法(ELISA法)、イムノプロットティング法、免疫組織染色法等が用いられる。

【0080】

ELISA法としては、サンドイッチELISAや競合ELISAが挙げられるが、サンドイッチELISAが望ましい。サンドイッチELISA法に用いる抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体などの抗体およびそれらの免疫反応性断片のうちいずれを用いてもよい。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、ポリクローナル抗体などの抗体およびそれらの免疫反応性断片のうちいずれを用いても良いが、高感度のサンドイッチELISAを行うためには、異なる抗原結合活性を有する2種類のモノクローナル抗体の組み合わせが好ましい。

30

【0081】

また、リン酸化 カテニンを特異的に検出する場合、一方の抗体には カテニン特異的な抗体を、一方の抗体には本発明の86位アミノ酸リン酸化選択的抗 カテニン抗体または254位アミノ酸リン酸化選択的抗 カテニン抗体を用いるのが好ましい。

40

【0082】

非リン酸化 カテニンを特異的に検出する場合には、使用する2種類の抗体が同一のエピトープを認識しておらず、互いに カテニンへの結合を阻害しない抗体であれば、いかなる カテニン結合抗体も利用することができる。

【0083】

固相に結合させる抗体および標識する抗体は、上記の抗体のいずれでもよい。抗体の標識方法としては、放射性同位元素、酵素、蛍光、発光などで標識する方法が挙げられるが、酵素での標識が好ましい。

【0084】

ELISA法を利用した カテニンのリン酸化の度合いを調べる方法としては、以下の方法

50

が挙げられる。

【0085】

第一に、上記のサンドイッチELISAにおいて、固相に結合させる抗体および標識抗体として、リン酸化されていない カテニンに結合する抗体を使用し、被験試料中に含まれるリン酸化されていない カテニンを検出する。

【0086】

第二に、固相に結合させる抗体または標識抗体のいずれか一方に、本発明の86位チロシンリン酸化選択的抗 カテニン抗体または254位チロシンリン酸化選択的抗 カテニン抗体を使用して、被験試料中に含まれる配列番号1で表されるアミノ酸配列における86位または254位のチロシンがリン酸化された カテニンのみを特異的に検出する。

10

【0087】

このようにして検出された非リン酸化 カテニン量とリン酸化 カテニン量を比較することにより、被験試料中の カテニン量および カテニンのリン酸化の度合いを測定することができる。

【0088】

イムノプロットティング法を利用した カテニンのリン酸化の度合いを調べる方法としては、具体的には、メンブレン上に固定した細胞抽出物または被験物質と、第一の抗体とを反応させた後、標識した第二の抗体を反応させる方法を用いることができる。

【0089】

イムノプロットティング法に用いる抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれを用いてもよく、上述したFab、Fab'、F(ab')₂などの免疫反応性断片を用いてもよい。

20

【0090】

第一の抗体としては、例えば、本発明の86位チロシンリン酸化選択的抗 カテニンモノクローナル抗体もしくは254位チロシンリン酸化選択的抗 カテニンモノクローナル抗体、それらの免疫反応性断片、または非リン酸化 カテニンモノクローナル抗体もしくはその免疫反応性断片を使用することができる。

【0091】

第二の抗体としては、第一の抗体に反応できる抗体であればいかなる抗体を用いてもよく、例えば、抗マウスイムノグロブリン抗体が用いられる。

30

【0092】

標識方法としては、放射性同位元素、酵素、蛍光、発光などによる標識が挙げられるが、酵素での標識が好ましい。

【0093】

免疫組織染色法を利用して カテニンリン酸化の度合いを調べる方法は、イムノプロットティング法と同様に行うことができる。具体的には、プレパレート上に固定した臨床組織材料と第一の抗体とを反応させた後、標識した第二の抗体を反応させる。臨床組織としては、癌化が疑われる組織およびその抽出物等が挙げられ、生検試料および手術摘出組織を使用することが好ましい。

【0094】

免疫組織染色法において染色された組織の部位は、配列番号1のアミノ酸配列で表される カテニンの86位または254位チロシンがリン酸化されていることを示す。そして、リン酸化の度合いの高い組織を有する患者は、癌患者として判別することができる。

40

【0095】

また、癌患者の腫瘍組織を上記と同様の方法で経時的に染色することにより、カテニンの86位または254位チロシンのリン酸化の度合いを測定して、癌の増殖または浸潤を判別することができる。

【0096】

さらに、癌患者の腫瘍組織と腫瘍組織近傍の組織を上記と同様の方法で染色し、カテニンの86位または254位チロシンのリン酸化の度合いを比較することにより、癌の転

50

移について判別することができる。

【0097】

なお、イムノプロット法、ならびに免疫組織染色はAntibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, 1988等の実験書に記載する方法で行うことができる。

【0098】

(2)本発明の抗体、その免疫反応性断片または誘導体を用いた癌の治療剤

本発明の抗体、その免疫反応性断片または誘導体は、配列番号1で表されるアミノ酸配列における86位のチロシンまたは254位のチロシンがリン酸化されたカテニンを選択的に認識し、リン酸化カテニンの86位または254位のリン酸化チロシンに特異的に結合することができる。従って、リン酸化されたカテニンが関連する癌関連遺伝子の転写活性化を抑制することにより、癌の治療剤として用いることができる。

10

【0099】

上述した薬剤は、単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理的に許容される一つ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望ましい。

【0100】

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与を挙げることができる。

20

【0101】

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、坐剤、注射剤、軟膏、テープ剤等が挙げられる。

【0102】

経口投与に適切な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等が挙げられる。

【0103】

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、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、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、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、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。

30

【0104】

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、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、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、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、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。

【0105】

非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、坐剤、噴霧剤等が挙げられる。

注射剤は、塩溶液、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。

40

坐剤はカカオ脂、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。

【0106】

また、噴霧剤は該化合物または抗体そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物または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。

【0107】

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該化合物または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。

50

【0108】

本医薬組成物の投与量は、患者の年齢、症状等によって異なるが、ヒトを含む哺乳動物に対し、各化合物または抗体として0.1~20mg/kg/日投与する。投与は、各化合物または抗体を同時に投与する場合は、1日1回（単回投与または連日投与）または間歇的に1週間に1~3回、2、3週間に1回、別々に投与する場合は、各々の化合物または抗体を、適宜時間をおいて、1日1回（単回投与または連日投与）または間歇的に1週間に1~3回、2、3週間に1回静脈注射により行う。

【0109】

(3) カテニンの86位または254位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質をスクリーニングする方法

上記1で得られた抗体、その免疫反応性断片または誘導体とカテニンを発現する細胞を用いて、配列番号1のアミノ酸配列で表されるカテニンの86位または254位チロシンのリン酸化を阻害する物質をスクリーニングすることができる。

【0110】

具体的には、カテニンを発現していると思われる細胞または該細胞の抽出物およびカテニンをリン酸化できる物質と被験試料とを接触させた後、上記2の(1)に記載のカテニンのリン酸化量を測定する方法を用いてカテニンのリン酸化量を測定し、被験試料中に含まれる配列番号1のアミノ酸配列で表されるカテニンの86位または254位のチロシンのリン酸化を阻害する物質を選択することができる。

【0111】

被験物質としては、カテニンと溶液状態で混合できるものであれば特に限定されず、例えば、低分子化合物、高分子化合物、有機化合物、無機化合物、蛋白質、遺伝子、ウイルス、細胞などが挙げられる。遺伝子を除く被験物質は、反応液中に直接添加すればよい。

【0112】

遺伝子を効率的に培養系に導入する方法としては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス等のウイルスベクターに乗せて培養系に添加する方法、またはリポソームなどの人工的なベジクル構造に封入して培養系に添加する方法などが挙げられる。その具体例としては、組換えウイルスベクターを用いた遺伝子解析に関する報告 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733, 1995、Nucleic Acids Res., 18, 3587, 1990、Nucleic Acids Res., 23, 3816, 1995] を挙げることができる。

【0113】

本発明のスクリーニング方法としては、免疫学的測定法を利用したスクリーニング方法が挙げられる。免疫学的測定法としては、任意の公知の免疫学的測定方法が挙げられる。免疫学的測定法としては、例えば、競合法、サンドイッチ法 [免疫学イラストレイテッド 第5版 (南江堂)] が挙げられるが、サンドイッチ法が好ましい。

【0114】

サンドイッチ法を利用したスクリーニング法とは、具体的には、固相に第一の抗体を結合させた後、被験試料と、EGF (epidermal growth factor) やHGF (hepatocyte growth factor) などの増殖因子含有培地で培養したカテニンが発現していると思われる細胞または細胞の抽出物とを反応させた後、標識した第二の抗体を反応させる方法である。

【0115】

サンドイッチ法に用いる抗体としては、ポリクローナル抗体モノクローナル抗体のいずれを用いてもよく、上述したFab、Fab'、F(ab')₂、などの免疫反応性断片を用いてもよい。

【0116】

サンドイッチ法で用いる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、ポリクローナル抗体などの抗体およびそれらの免疫反応性断片のうちいずれを用いてもよいが、高感度のサンドイッチELISAを行うためには、異なる抗

10

20

30

40

50

原結合活性を有する2種類のモノクローナル抗体の組み合わせが好ましい。

【0117】

例えば、86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体もしくは254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体とは別のエピトープを認識する抗カテニン抗体またはその抗体断片と、86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体もしくは254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体またはその免疫反応性断片との組み合わせが挙げられる。固相に結合させる抗体および標識する抗体は、2つの抗体のいずれでもよい。

【0118】

標識方法としては、放射性同位元素、酵素、蛍光、発光などによる標識が挙げられるが、酵素での標識が好ましい。

【0119】

以下に本発明のスクリーニング方法の一態様を具体的に説明する。

96ウェルプレートに86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体または254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体を分注し、4℃で一晩放置して吸着させる。洗浄後、1%牛血清アルブミンを含むPBSを加えて、室温で1時間静置して非特異的吸着をブロックする。PBSで洗浄後、EGF(epidermal growth factor)やHGF(hepatocyte growth factor)等の増殖因子を含まない培地で培養したカテニンを発現している細胞の細胞抽出液を分注した後に、EGFやHGF等の増殖因子および試験物質を添加してカテニンを活性化し反応させる。洗浄後に86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体または254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体に結合したカテニンの量を、86位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体または254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体とは別のエピトープを認識する抗カテニン抗体を用いて酵素免疫測定法により測定する。

【0120】

またはウェルに結合したカテニンに結合しうるアダプター分子の結合量を、アダプター分子の標識体またはアダプター分子に対する抗体を用いて酵素免疫測定法により測定する。試験物質を添加しない場合のカテニンの結合量またはカテニンと結合したアダプター分子の結合量と、試験物質を添加した場合の結合量とを比較することにより、配列番号1のアミノ酸配列で表されるカテニンの86位または254位のチロシンのリン酸化を阻害する物質、あるいは配列番号1で表されるアミノ酸配列における86位または254位のチロシンがリン酸化されたカテニンとアダプター分子の結合を阻害する物質をスクリーニングすることができる。

【0121】

アダプター分子としては、Eカドヘリン、カテニン、転写因子であるLEF1、またはTCF-4などが挙げられる。

【0122】

(4)ドラッグデザインによるカテニンの86位または254位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質の取得方法

カテニンの細胞内領域およびチロシンキナーゼドメインの構造を、X線結晶解析またはNMR解析などの構造解析により得られた数値をもとに、計算機上のシミュレーションを行ってカテニンと情報伝達分子との結合領域を推定し、かつそれらの分子間結合を阻害することが可能な化合物を既存のデータベースまたはコンピューターソフトを用いてデザインして該化合物を合成することにより、カテニンのリン酸化の阻害剤を取得することができる。

【0123】

チロシンキナーゼドメインとしては、カテニンと相互作用して、カテニンをリン酸化できる酵素蛋白質であれば、いかなる酵素蛋白質でもよく、例えば、EGF受容体やHGF受容体などの増殖因子受容体のチロシンキナーゼドメイン、またはwntシグナルを伝達するGSK-3のチロシンキナーゼドメインが挙げられる。

【0124】

10

20

30

40

50

また、カテニンの86位または254位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質は、配列番号1で表されるアミノ酸配列における86位または254位をリン酸化するチロシンキナーゼドメインの構造を、X線結晶解析またはNMR解析などによる構造解析により得られた数値をもとに計算機上のシミュレーションにより、推定して新規化合物を既存のデータベースから選択するか、またはコンピューターソフトを用いてデザインすることにより、カテニンのリン酸化を特異的に阻害する物質を設計することができる。

【0125】

コンピューターソフトとしては、蛋白質の立体構造予測からドラッグデザインに一般的に用いられているコンピューターソフトであれば、いかなるソフトを使用することもできる。具体的には、(1) 構造未知のタンパク質の立体構造を構造が既知の類似蛋白質の立体構造から自動構築する場合には、例えば、Insight II/Modeler (Accelrys) が用いられる。(2) タンパク質の立体構造からリガンド結合部位を予測する場合には、例えば、Cerius 2/LigandFit (Accelrys) が用いられる。(3) タンパク質の立体構造がわかっている、リガンド結合部位がほしい(領域として)わかっているときに、リガンドの結合様式を予測する場合、または任意の化合物が結合(阻害)するかどうか予測する場合には、例えば、Insight II/Affinity (Accelrys)、GOLD (CCDC)、FlexX (Tripos)、DOCK (Prof. Kuntz) が用いられる。(4) リガンド結合部位から、結合(阻害)すると予想される化合物をデザインする場合には、例えば、Insight II/Ludi (Accelrys) が用いられる。

10

【0126】

上記でデザインした化合物を製造し、前記2の(3)のスクリーニング方法で示したアッセイ方法に供することにより、阻害活性を有しているか否かを確認することができる。

20

以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例】

【0127】

略号について

本発明において使用したアミノ酸およびその保護基に関する略号は、生化学命名に関するIUPAC-IUB委員会(IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature)の勧告[European Journal of Biochemistry, 138, 9, 1984]に従った。

【0128】

以下の略号は、特に断わらない限り対応する下記のアミノ酸を表す。

30

Ala: L-アラニン

Asp: L-アスパラギン酸

Asx: L-アスパラギン酸またはL-アスパラギン

Arg: L-アルギニン

Cys: L-システイン

Gln: L-グルタミン

Glx: L-グルタミン酸またはL-グルタミン

Gly: グリシン

Ile: L-イソロイシン

Leu: L-ロイシン

40

Met: L-メチオニン

Phe: L-フェニルアラニン

Ser: L-セリン

Thr: L-スレオニン

Tyr: L-チロシン

pTyr: L-ホスホチロシン

Met: L-メチオニン

Val: L-バリン

【0129】

以下の略号は、対応する下記のアミノ酸の保護基および側鎖保護アミノ酸を表す。

50

Fmoc: 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル

tBu: t-ブチル

Bzl: ベンジル

Trt: トリチル

Pmc: 2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルフォニル

Fmoc-Arg(Pmc)-OH:N -9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N⁹-2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル-L-アルギニン

Fmoc-Asp(OtBu)-OH: N -9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸-t-ブチルエステル

Fmoc-Cys(Trt)-OH:N -9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-S-トリチル-L-システイン

Fmoc-Gln(Trt)-OH:N -9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N -トリチル-L-グルタミン

Fmoc-Ser(tBu)-OH:N -9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-O-t-ブチル-L-セリン

Fmoc-Thr(tBu)-OH:N -9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-O-t-ブチル-L-スレオニン

Fmoc-Tyr(tBu)-OH:N -9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-O-t-ブチル-L-チロシン

Fmoc-Tyr(PO(OBzl)OH)-OH: N -9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-O-ベンジル-L-ホスホチロシン

【0130】

以下の略号は、対応する下記の反応溶媒、反応試薬等を表す。

HBTU: 2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム・ヘキサフルオロホスフェート

HOBt: N-ヒドロキシベンゾトリアゾール

DIEA: ジイソプロピルエチルアミン

DMF: N,N-ジメチルホルムアミド

TFA: トリフルオロ酢酸

【0131】

以下の実施例において、化合物の理化学的性質は以下の方法により測定した。

質量分析は、日本電子JMS-HX110Aを用いFAB-MS法により、もしくはブルカー社質量分析装置REFLEXを用いMALDI-TOFMS法により行った。アミノ酸分析は、コーエンらの方法 [Analytical Biochemistry, 222, 19, 1994] により行った。加水分解は塩酸蒸気中110 で20時間行い、加水分解物のアミノ酸組成はウォーターズ・アキュ・タグ (Waters AccQ-Tag) アミノ酸分析計 (Waters社製) を用い分析した。

【0132】

実施例1. 86位または254位チロシンリン酸化選択的抗カテニン抗体の作製

(1) 抗原ペプチドの調製

配列番号1に示したカテニン蛋白質のアミノ酸配列を解析し、親水性の高い部分、N末端、C末端、二次構造上ターン構造、ランダムコイル構造を有する部分の中から、抗原として適当と考えられる配列番号2および配列番号4で示される部分アミノ酸配列を2つ選択し、アミノ酸配列に基づきペプチド化合物を作製した(化合物1および3)。さらにそれぞれの部分配列の中でリン酸化部位であると考えられるチロシン残基を特定し、配列番号3および配列番号5で示される2つの部分配列でチロシン残基がリン酸化されたペプチドおよびリン酸化していないペプチド(化合物2および4)を以下のように作製した。

【0133】

(1)-1 化合物1 (bCAT-86Y) (配列番号2)

(H-Cys-Asp-Ile-Asp-Gly-Gln-Tyr-Ala-Met-Thr-Arg-Ala-NH₂) の合成

Fmoc-NH、27.5 μmolが結合した担体樹脂 (Rink amide MBHA resin樹脂、ノババイオケム社製) 50mgを自動合成機 (島津製作所製) の反応容器に入れ、600 μlのDMFを加えて3分間攪拌し溶液を排出した後、島津製作所の合成プログラムに従って、以下の操作を行った。

(a) 30%ピペリジン-DMF溶液500 μ lを加えて混合物を4分間攪拌し、該溶液を排出し、この操作をさらに1回繰り返した。

(b) 担体樹脂を600 μ lのDMFで1分間洗浄し、該溶液を排出し、この操作を5回繰り返した。

(c) Fmoc-Ala-OH(275 μ mol)、HBTU(275 μ mol)、HOBt 1水和物(275 μ mol)およびDIEA(550 μ mol)をDMF(1.10ml)中で3分間攪拌し、得られた溶液を樹脂に加えて混合物を60分間攪拌し、溶液を排出した。

【0134】

担体樹脂を600 μ lのDMFで1分間洗浄後溶液を排出し、これを5回繰り返した。このようにして、Fmoc-Ala-NHを担体上に合成した。

【0135】

次に、(a)(b)の工程の後、(c)の工程でFmoc-Arg(Pmc)-OHを用いて縮合反応を行い、(d)の洗浄工程を経て、Fmoc-Arg(Pmc)-Ala-NHが担体上に合成された。

以下、工程(c)において、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OHを順次用いて、(a)~(d)を繰り返した後、(a)(b)の脱保護、洗浄工程を経て、メタノール、ブチルエーテルで順次洗浄し、減圧下12時間乾燥して、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。これに、TFA(82.5%)、チオアニソール(5%)、水(5%)、エチルメチルスルフィド(3%)、1,2-エタンジチオール(2.5%)およびチオフェノール(2%)からなる混合溶液1mlを加えて室温で8時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。樹脂を濾別後、得られた溶液にエーテル約10mlを加え、生成した沈澱を遠心分離およびデカンテーションにより回収し、粗ペプチドとして41.5mgを取得した。この粗生成物全量を酢酸水溶液に溶解後、逆相カラム(資生堂製、CAPCELL PAK C18 30mmI.D. X 250mm)を用いたHPLCで精製した。0.1% TFA水溶液に、TFA 0.1%を含む90%アセトニトリル水溶液を加えていく直線濃度勾配法で溶出し、220nmで検出し、化合物1を含む画分を得た。この画分を凍結乾燥して、11.4mgの以下の物理化学的性質を有する化合物1を得た。

質量分析[TOFMS]; $m/z = 1342.5 (M+H^+)$

アミノ酸分析; Asx 2.1 (2), Glx 1.1 (1), Gly 1.1 (1), Arg 1.1 (1), Thr 1.0 (1), Ala 2.1 (2), Tyr 0.9 (1), Met 0.6 (1), Ile 1.0 (1), Cys 1.4 (1)

【0136】

(1)-2 化合物2 (bcAT-86pY) (配列番号3)

(H-Cys-Asp-Ile-Asp-Gly-Gln-pTyr-Ala-Met-Thr-Arg-Ala-NH₂)の合成

Fmoc-NH、27.5 μ molが結合した担体樹脂(Rink amide MBHA resin樹脂、ノババイオケム社製)50mgを出発物質として、上記(1)-1と同様に、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Tyr(PO(OBzl)OH)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OHを順次縮合した後に、Fmoc基除去、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。これに、TFA(82.5%)、チオアニソール(5%)、水(5%)、エチルメチルスルフィド(3%)、1,2-エタンジチオール(2.5%)およびチオフェノール(2%)からなる混合溶液1mlを加えて室温で8時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。樹脂を濾別後、得られた溶液にエーテル約10mlを加え、生成した沈澱を遠心分離およびデカンテーションにより回収し、粗ペプチドとして38.7mgを取得した。この粗生成物全量を酢酸水溶液に溶解後、逆相カラム(資生堂製、CAPCELL PAK C18 30mmI.D. X 250mm)を用いたHPLCで精製した。0.1% TFA水溶液に、TFA 0.1%を含む90%アセトニトリル水溶液を加えていく直線濃度勾配法で溶出し、220nmで検出し、化合物2を含む画分を得た。この画分を凍結乾燥して、14.1mgの以下の物理化学的性質を有する化合物2を得た。

質量分析[TOFMS]; $m/z = 1422.6 (M+H^+)$

アミノ酸分析; Asx 2.1 (2), Glx 1.1 (1), Gly 1.0 (1), Arg 1.0 (1), Thr 1.0 (1), A

10

20

30

40

50

Ia 2.0 (2), Tyr 0.9 (1), Met 1.0 (1), Ile 0.9 (1), Cys 1.4 (1)

但し、アミノ酸分析においてホスホチロシンは加水分解によりチロシンとして検出された。

【0137】

(1)-3 化合物3 (bCAT-254Y) (配列番号4)

(H-Cys-Asp-Ser-Val-Leu-Phe-Tyr-Ala-Ile-Thr-Thr-Leu-NH₂) の合成

Fmoc-NH、27.5 μmol が結合した担体樹脂 (Rink Amide MBHA resin 樹脂、ノババイオケム社製) 50mg を出発物質として、上記(1)-1と同様に、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH を順次縮合した後に、Fmoc基除去、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。これに、TFA (90%)、チオアニソール (5%) および1,2-エタンジチオール (5%) からなる混合溶液1mlを加えて室温で2時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。樹脂を濾別後、得られた溶液にエーテル約10mlを加え、生成した沈澱を遠心分離およびデカンテーションにより回収し、粗ペプチドとして30.4mgを取得した。この粗生成物全量をジチオスレイトールおよびDMFからなる混合溶液に溶解し、逆相カラム (資生堂製、CAPCELL PAK C18 30mm I.D. X 250mm) を用いたHPLCで精製した。0.1% TFA水溶液に、TFA 0.1%を含む90%アセトニトリル水溶液を加えていく直線濃度勾配法で溶出し、220nmで検出し、化合物3を含む画分を得た。この画分を凍結乾燥して、2.9mgの以下の物理化学的性質を有する化合物3を得た。

質量分析 [TOFMS]; m/z = 1936.0 (M+H⁺)

アミノ酸分析; Asx 1.1 (1), Gly 0.9 (1), Thr 2.1 (2), Ala 1.2 (1), Tyr 1.0 (1), Val 0.7 (1), Ile 1.1 (1), Leu 1.9 (2), Phe 1.0 (1), Cys 1.3 (1)

【0138】

(1)-4 化合物4 (bCAT-254pY) (配列番号5)

(H-Cys-Asp-Ser-Val-Leu-Phe-pTyr-Ala-Ile-Thr-Thr-Leu-NH₂) の合成

Fmoc-NH、27.5 μmol が結合した担体樹脂 (NovaSyn TGR resin 樹脂、ノババイオケム社製) 50mg を出発物質として、上記(1)-1と同様に、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Tyr(PO(Obzl)OH)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH を順次縮合した後に、Fmoc基除去、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。これに、TFA (90%)、チオアニソール (5%) および1,2-エタンジチオール (2.5%) からなる混合溶液1mlを加えて室温で2時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。樹脂を濾別後、得られた溶液にエーテル約10mlを加え、生成した沈澱を遠心分離およびデカンテーションにより回収し、粗ペプチドとして34.1mgを取得した。この粗生成物全量をジチオスレイトールおよびジメチルスルホキシドからなる混合溶液に溶解し、逆相カラム (資生堂製、CAPCELL PAK C18 30mm I.D. X 250mm) を用いたHPLCで精製した。0.1% TFA水溶液に、TFA 0.1%を含む90%アセトニトリル水溶液を加えていく直線濃度勾配法で溶出し、220nmで検出し、化合物4を含む画分を得た。この画分を凍結乾燥して、2.9mgの以下の物理化学的性質を有する化合物4を得た。

質量分析 [TOFMS]; m/z = 1424.6 (M+H⁺)

アミノ酸分析; Asx 1.1 (1), Gly 1.0 (1), Thr 2.0 (2), Ala 1.0 (1), Tyr 0.9 (1), Val 0.9 (1), Ile 1.0 (1), Leu 2.0 (2), Phe 1.0 (1), Cys 1.3 (1)

但し、アミノ酸分析においてホスホチロシンは加水分解によりチロシンとして検出された。

【0139】

(2) 免疫原の調製

実施例1(1)で得られた化合物1~4で示したペプチドのうち、化合物2 (bCAT-86pY) および化合物4 (bCAT-254pY) は、免疫原性を高める目的で以下の方法でKLH (ナカライテスク社製) とのコンジュゲートを作製し、免疫原とした。すなわち、KLHをPBSに溶解し

10

20

30

40

50

て10m/mLに調製し、1/10容量の25m/mL MBS[N-(m-Maleimidobenzoyloxy) succinimide; ナカライテスク社製]を滴下して30分間攪拌反応させた。あらかじめPBSで平衡化したセファデックスG-25カラムなどのゲルろ過カラムで未反応のMBSを除いて得られたKLH-MBS 2.5mgを0.1Mリン酸ナトリウムバッファー (pH7.0) に溶解したペプチド1mgと混合し、室温で3時間、攪拌反応させた。反応後、PBSで透析したものを免疫原として用いた。

【0140】

(3)動物の免疫と抗体産生細胞の調製

実施例1(2)で調製した化合物2および化合物4のKLHコンジュゲート100 μ gをそれぞれ水酸化アルミニウムアジュバント [Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 99, 1988] 2mgおよび百日咳ワクチン(千葉県血清研究所製) 1×10^9 細胞とともに6週令雌BDF1マウス各3匹に投与した。投与2週間後より、各KLHコンジュゲート100 μ gを1週間に1回、計4回投与した。該マウスの眼底静脈叢より採血し、その血清抗体価を以下に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したマウスから最終免疫3日後に脾臓を摘出した。

10

【0141】

脾臓をMEM (Minimum Essential Medium) 培地(日水製薬社製)中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離(280 \times g、5分間)した。得られた沈殿画分にトリス-塩化アンモニウム緩衝液(pH7.6)を添加し、1~2分間処理することにより赤血球を除去した。得られた沈殿画分(細胞画分)をMEM培地で3回洗浄し、細胞融合に用いた。

20

【0142】

(4)マウス骨髄腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髄腫細胞株P3-X63Ag8-U1 (P3-U1: ATCCより購入)を正常培地(10%ウシ胎児血清添加RPMI培地)で培養し、細胞融合時に 2×10^7 個以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

【0143】

(5)ハイブリドーマの作製

実施例1(3)で得られたマウス脾細胞と実施例1(4)で得られた骨髄腫細胞とを10:1になるよう混合し、遠心分離(280 \times g、5分間)した。得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37 $^{\circ}$ Cで、ポリエチレングリコール-1000 (PEG-1000) 2g、MEM培地2mLおよびジメチルスルホキシド0.7mLの混液を 10^8 個のマウス脾細胞あたり0.5mLに加え、該懸濁液に1~2分間毎にMEM培地1mLを数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50mLになるようにした。

30

【0144】

該懸濁液を遠心分離(170 \times g、5分間)し、得られた沈殿画分の細胞をゆるやかにほぐした後、該細胞を、メスピペットによる吸込み吸出しでゆるやかにHAT培地[10%ウシ胎児血清添加RPMI培地にHAT培地添加物(GIBCO BRL社製)を加えた培地]100mL中に懸濁した。該懸濁液を96ウェル培養用プレートに200 μ L/ウェルずつ分注し、5%CO₂インキュベーター中、37 $^{\circ}$ Cで10~14日間培養した。

【0145】

培養後、培養上清を実施例1(6)に記載した酵素免疫測定法を用いて、抗原ペプチドとして用いた化合物2および化合物4に対して、同じアミノ酸配列であるがリン酸化されていないコントロールペプチドとして用いた化合物1および化合物3と比較して、強い反応性を示すウェルを選び、そこに含まれる細胞から限界希釈法によるクローニングを2回繰り返し、86位チロシンリン酸化選択的抗カテニンモノクローナル抗体産生ハイブリドーマまたは254位チロシンリン酸化選択的抗カテニンモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを確立した。化合物2を抗原ペプチドとして用いてKM2890およびKM2891、化合物4を抗原ペプチドとして用いてKM2850~KM2858、KM2972~KM2974の計14クローンを取得した。

40

【0146】

(6)酵素免疫測定法(バインディングELISA)

50

アッセイ用の抗原には実施例 1 (1) で得られた化合物 1 ~ 4 をサイログロブリン (以下、THYと表記する) とコンジュゲートしたものをを用いた。作製方法は実施例 1 (2) に記した通りであるが、架橋剤にはMBSの代わりにSMCC [4-(N-Maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylic acid N-hydroxysuccinimido ester; シグマ社製] をを用いた。化合物 2 については化合物 2 と同一配列を有する非リン酸化ペプチドである化合物 1 (bCAT-86Y) を、化合物 4 については同様に化合物 3 (bCAT-254Y) をそれぞれの陰性対照ペプチドとして、同様にTHYとコンジュゲートして用いた。96ウェルのELISA用プレート (グライナー社製) に、上記のように調製したコンジュゲートを $5\mu\text{g}/\text{mL}$ で $50\mu\text{L}$ /ウェルで分注し、4 で一晩放置して吸着させた。該プレートを洗浄後、1%牛血清アルブミン (以下、BSAと表記する) を含むダルベッコリン酸バッファー (Phosphate buffered saline: PBS) (以下、1% BSA/PBSと表記する) を $100\mu\text{L}$ /ウェル加え、室温で1時間放置し、残存している活性基をブロックした。1% BSA/PBSを捨て、該プレートに一次抗体として被免疫マウス抗血清、ハイブリドーマの培養上清もしくは精製モノクローナル抗体を $50\mu\text{L}$ /ウェルで分注し、2時間放置した。該プレートを0.05%ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート [(ICI社商標Tween 20相当品: 和光純薬社製)] /PBS (以下Tween-PBSと表記する) で洗浄後、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスイムノグロブリン (ダコ社製) を $50\mu\text{L}$ /ウェルで加えて室温、1時間放置した。該プレートをTween-PBSで洗浄後、ABTS基質液 [2,2-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸) 、 $1\text{mmol}/\text{L}$ / $0.1\text{mol}/\text{L}$ クエン酸バッファー (pH4.2)] を $50\mu\text{L}$ /ウェルで添加して発色させ、OD415nmの吸光度をプレートリーダー (Emax; Molecular Devices社製) を用いて測定した。

10

20

【0147】

(7)モノクローナル抗体の精製

プリスタン処理した8週令ヌード雌マウス (BALB/c) に実施例 1 (5) で得られたハイブリドーマ株を $5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 細胞/匹それぞれ腹腔内注射した。10~21日後、ハイブリドーマが腹水癌化することにより腹水のたまったマウスから、腹水を採取した。

【0148】

該腹水を遠心分離 ($1200 \times g$ 、5分間) し固形分を除去した。精製IgGモノクローナル抗体は、カプリル酸沈殿法 [Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988] により精製することにより取得した。ハイブリドーマKM2850~KM2858、KM2890、KM2891およびKM2972~KM2974が生産するモノクローナル抗体のサブクラスは、サブ

30

【0149】

【表 1】

ハイブリドーマ	抗体クラス
KM2850	IgG1
KM2851	IgG1
KM2852	IgG1
KM2853	IgG1
KM2854	IgG1
KM2855	IgG1
KM2856	IgG2a
KM2857	IgG2a
KM2858	IgG1
KM2890	IgG1
KM2891	IgG1
KM2972	IgG1
KM2973	IgG1
KM2974	IgG1

10

20

【0150】

実施例 2 . モノクローナル抗体の反応性の検討

(1) 抗原固相系における抗原ペプチドとの反応性 (バインディングELISA)

実施例 1 (6) に示した方法に従って行った。1次抗体には実施例 1 (5) で得られたハイブリドーマの培養上清を 5 倍希釈で 6 段階に希釈したものをを用いた。結果を図 1 に示す。すべてのモノクローナル抗体が、陰性対照の非リン酸化ペプチド (化合物 1 または 3) と比較して、リン酸化抗原ペプチド (化合物 2 または 4) に強い反応性を示した。

30

【0151】

(2) 抗原液相系における抗原ペプチドに対する反応性 (インヒビションELISA)

実施例 1 (6) で化合物 2 を抗原ペプチドに用いて作製された 86 位チロシンリン酸化選択的抗カテニンモノクローナル抗体の、化合物 1 ~ 4 に示される各種ペプチドに対する反応性を、インヒビションELISAで調べた。実施例 1 (6) と同様に抗原を固相化したプレートを準備し、10 µg/mL から 10 倍希釈で段階的に希釈した化合物を 50 µL/ウェルで分注後、ハイブリドーマ KM2890 または KM2891 の培養上清を 2000 倍に希釈して 50 µL/ウェルで分注し、ウェル内で混合して室温で 2 時間反応させた。ウェルを Tween - PBS で洗浄後、希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスイムノグロブリン (ダコ社製) を 50 µL/ウェルで加えて室温、1 時間反応させ、Tween-PBS で洗浄後 ABTS 基質液 [2,2'-アジノビス (3-エチルペンゾチアゾール-6-スルホン酸) アンモニウム] を 50 µL/ウェルで添加して発色させ、OD_{415nm} の吸光度をプレートリーダー (Emax; 和光純薬社製) にて測定した。

40

【0152】

図 2 に示すように、86 位チロシンリン酸化選択的抗カテニンモノクローナル抗体 (KM2890 由来 (1) および KM2891 由来 (2)) はいずれも液相系においてアミノ酸配列の異なる化合物 3 および 4 には反応しなかった。また、同一アミノ酸配列ではあるがリン酸化されていない陰性対照である化合物 1 と比較して、リン酸化ペプチドである化合物 2 とは 10 ~ 100 倍強く反応した。

【0153】

50

(3)ウエスタンブロッティング

ヒト扁平上皮癌細胞株A431 (ATCC No. CRL-1555) とヒト胃癌細胞株TMK-1 [Jpn. J. Cancer Rec., 76, 1064-1071, 1985] を血清無添加のRPMI培地で48時間培養後、50ng/mLになるように上皮増殖因子EGFを添加し、0時間と0.5時間後にEDTA溶液を用いて回収して以下のように細胞溶解液を調製した。また、比較対照として無血清培養、上皮増殖因子EGF処理をせず10%FCS添加したRPMI培地で培養した細胞からも細胞溶解液を調製した。

【0154】

回収した細胞をPBSで洗浄した後、細胞溶解用緩衝液(50mM Tris-HCl pH7.2, 1% Triton X, 50mM NaCl, 2mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, 0.1% NaN₃, 50mM ヨードアセトアミド, 50mM N-エチルマレイミド, 1mg/ml ロイペプチン, 0.1mM ジチオスレイトール)を5×10⁷細胞に1 mL添加し、4、0.5時間放置後、遠心分離して得られた上清画分を細胞溶解液として用いた。得られた細胞溶解液にSDS-PAGE用サンプルバッファーを加え100、5分加熱し、1×10⁵細胞分/レーンでSDS-ポリアクリルアミド電気泳動(5%濃縮ゲル、7.5%分離ゲル、200V、45分間) [Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988] にて分画後、セミドライ型ブロッティング装置にてPVDF膜にブロッティング(25V、30分間または60分間)した。5% Skimmilk, 1% BSA, 0.1% Tween-PBSで2時間ブロッティング後、86位チロシンリン酸化選択的抗カテニンモノクローナル抗体ハイブリドーマ(KM2891)または254位チロシンリン酸化選択的抗カテニンモノクローナル抗体ハイブリドーマ(KM2853)の培養上清を4で一晩反応させた。0.1% Tween-20, 1mM Orthovanadate-PBSでよく洗浄した後、第二抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgGグロブリン抗体〔ザイメット社製〕を1時間反応させた。0.1% Tween, 1mM Orthovanadate-PBSでよく洗浄した後、検出はECL detection kit (Amersham-Pharmacia社製)を用いて行い、X線フィルム上に感光させた。

【0155】

図3に、86位チロシンリン酸化選択的抗カテニンモノクローナル抗体(KM2891由来)でのウエスタンブロッティングの結果を示した。無血清培養後、上皮増殖因子EGFを添加して0.5時間経過したTMK-1細胞では、上皮増殖因子EGF添加直後のTMK-1細胞と比較して、86位チロシンリン酸化選択的抗カテニンモノクローナル抗体(KM2891由来)で検出されるバンドのシグナルは明らかに増強していた。従って、86位チロシンリン酸化選択的抗カテニンモノクローナル抗体(KM2891由来)は、上皮増殖因子EGF刺激で配列番号1で表されるアミノ酸配列における86位チロシン残基がリン酸化されたカテニンに、非リン酸化カテニンと比較してより強く結合し、ウエスタンブロッティングにより配列番号1で表されるアミノ酸配列における86位チロシン残基がリン酸化されたカテニンを検出できることが示された。

【0156】

図4に254位チロシンリン酸化選択的抗カテニンモノクローナル抗体(KM2853由来)でのウエスタンブロッティングの結果を示した。無血清培養後、上皮増殖因子EGFを添加して0.5時間経過したA431細胞では、上皮増殖因子EGF添加直後のA431細胞と比較して、254位チロシンリン酸化選択的抗カテニンモノクローナル抗体(KM2853由来)で検出されるバンドのシグナルは明らかに増強していた。従って、254位チロシンリン酸化選択的抗カテニンモノクローナル抗体(KM2853由来)は、上皮増殖因子EGF刺激で配列番号1で表されるアミノ酸配列における254位チロシン残基がリン酸化されたカテニンに非リン酸化カテニンと比較してより強く結合し、ウエスタンブロッティングにより配列番号1で表されるアミノ酸配列における254位チロシン残基がリン酸化されたカテニンを検出できることが示された。

【0157】

(4)免疫組織染色(ABC法)

検体としてホルマリン固定後、パラフィン包埋処理を施したヒト舌癌(扁平上皮癌)切片を用いた。切片はキシレン-エタノール系列にて脱パラフィン、親水化を行い、流水水洗後、0.3%過酸化水素-メタノール溶液にて内因性のペルオキシダーゼを失活させた。抗

原賦活処理として1mM Orthovanadate-0.01Mクエン酸バッファー (PH6.0) 中でマイクロウェーブ処理 (95℃、20分間) を行った。流水および0.1% Tween-PBSにて洗浄後、5% Skim milk-1% BSA-1mM Orthovanadate-0.1% Tween-PBSにて40分間ブロッキングした。2% NSS-1mM Orthovanadate-PBSにて処理 (3分間) した後、一次抗体として86位または254位チロシンリン酸化選択的抗カテニンモノクローナル抗体のハイブリドーマ培養上清を4℃で一晩反応させた。0.1% Tween-PBSにて洗浄後2% NSS-1mM Orthovanadate-PBSにて処理 (3分間) した後、二次抗体としてビオチン化抗マウスイムノグロブリン (VECTOR社製) を室温で45分間反応させた。0.1% Tween-PBSにて洗浄後、2% NSS-1mM Orthovanadate-PBSにて処理 (3分間) した後、sABC試薬 (ダコ社製) を室温で40分間反応させた。0.1% Tween-PBSにて洗浄後ジアミノベンチジン水溶液を3~20分間反応させて発色させた。流水水洗後ヘマトキシリンにて核染色し、流水水洗後、エタノール-キシレン系列にて脱水、透徹を行った後、封入、検鏡した。

10

【0158】

86位チロシンリン酸化選択的抗カテニンモノクローナル抗体 (KM2891由来) または254位チロシンリン酸化選択的抗カテニンモノクローナル抗体 (KM2853由来) を一次抗体に用いた染色の結果、癌細胞の細胞膜部分が特異的に染色された。したがって、これらの抗体は、免疫組織染色において癌組織における配列番号1のアミノ酸配列で表されるカテニンの86位または254位チロシンのリン酸化亢進をそれぞれ検出できることが明らかとなった。

【図面の簡単な説明】

20

【0159】

【図1】モノクローナル抗体のバインディングELISAにおける抗原ペプチド選択的な反応性を示す。横軸は、ELISAに用いた各抗体産生ハイブリドーマの培養上清の希釈倍率を、縦軸は吸光度を示す。

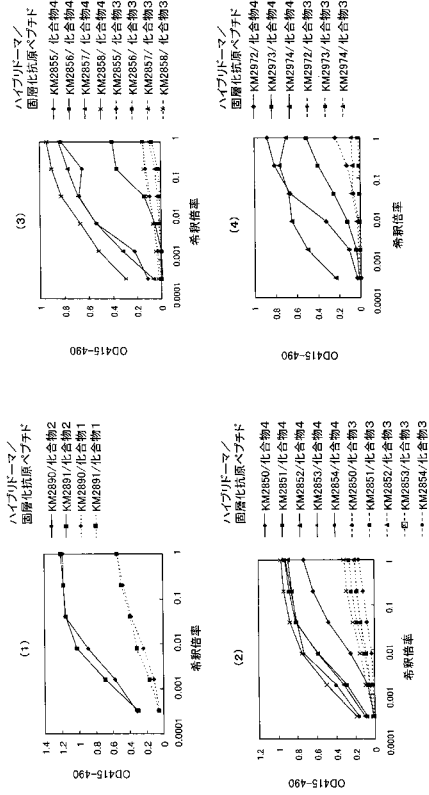
【図2】モノクローナル抗体の、インヒビションELISAにおける抗原ペプチド選択的な反応性を示す。横軸は、反応系に添加したペプチドである化合物1~4の濃度を、縦軸は吸光度を示す。

【図3】86位チロシンリン酸化選択的抗カテニンモノクローナル抗体 (KM2891由来) のウェスタンブロッティングにおける反応性を示す。図中SFMは無血清培養、FBS Mは血清添加培養を示す。レーン是用いた細胞毎に左から、無血清培養後にEGFを添加した直後、0.5時間後、さらに血清添加培養時の細胞を示す。矢印はカテニンのバンドを示す。

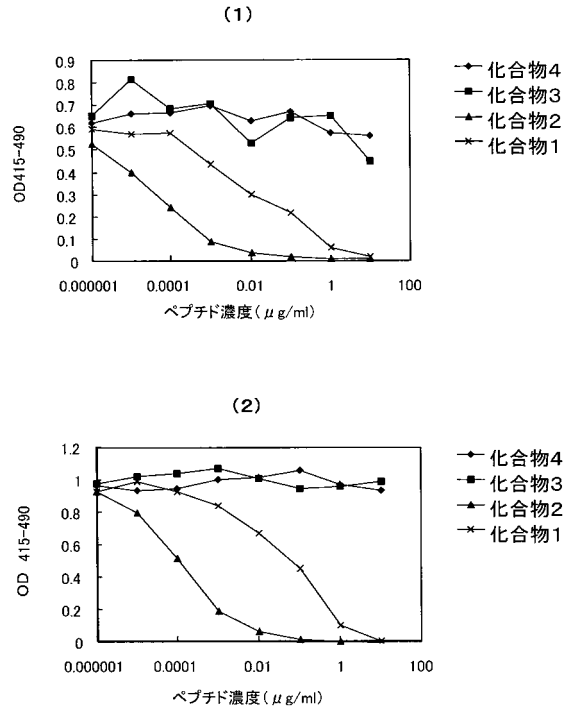
30

【図4】254位チロシンリン酸化選択的抗カテニンモノクローナル抗体 (KM2853由来) のウェスタンブロッティングにおける反応性を示す。A431細胞を用いた各レーン是用いた細胞毎に左から、無血清培養後にEGFを添加した直後、0.5時間後、さらに血清添加培養時の細胞を示す。

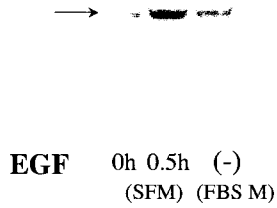
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【配列表】

2005089354000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09	G 0 1 N 33/50	Z 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 15/00	A
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 15/00	C
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	B
	C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 落合 淳志

千葉県柏市柏の葉6丁目5番1号 国立がんセンター 研究所支所内

(72)発明者 設楽 研也

東京都町田市旭町3丁目6-6 協和醗酵工業株式会社東京研究所内

(72)発明者 古谷 安希子

東京都町田市旭町3丁目6-6 協和醗酵工業株式会社東京研究所内

Fターム(参考) 2G045 BB05 BB10 BB14 BB20 BB22 BB46 BB48 CB01 CB02 DA36
 FA29 FB03 FB07 GC10
 4B024 AA01 AA11 BA44 DA02 GA03 GA08 HA15
 4B064 AG27 CA19 CA20 CC24 CE03 DA01 DA13
 4B065 AA92X AA92Y AB01 AB05 AC14 BA08 BD14 CA25 CA44 CA46
 4C085 AA13 AA14 BB01 BB11 CC02 CC23 DD62 DD63 DD88 EE01
 GG02 GG03 GG04 GG08
 4H045 AA10 AA30 BA10 DA76 EA20 EA50 FA74 GA05

专利名称(译)	选择性识别磷酸化β-连环蛋白的抗体		
公开(公告)号	JP2005089354A	公开(公告)日	2005-04-07
申请号	JP2003323624	申请日	2003-09-16
[标]申请(专利权)人(译)	国立癌症中心总裁		
申请(专利权)人(译)	协和醱酵工业株式会社 国立癌症中心总裁		
[标]发明人	落合 淳志 設楽 研也 古谷 安希子		
发明人	落合 淳志 設楽 研也 古谷 安希子		
IPC分类号	G01N33/50 A61K39/395 A61P35/00 C07K16/18 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/15 G01N33/53		
FI分类号	C07K16/18.ZNA A61K39/395.E A61K39/395.T A61P35/00 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N15/00.A C12N15/00.C C12N5/00.B C12P21/08 C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	2G045/BB05 2G045/BB10 2G045/BB14 2G045/BB20 2G045/BB22 2G045/BB46 2G045/BB48 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/DA36 2G045/FA29 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/GC10 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/DA02 4B024/GA03 4B024/GA08 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE03 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA92X 4B065/AA92Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/BD14 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG08 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA05		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供用于诊断癌症发生，侵袭或转移的诊断剂，以及用于抑制癌症发生，侵袭，转移或增殖的治疗剂。解决方案：选择性识别β-catenin的抗体或其免疫反应片段，其中特定氨基酸序列中第86或254位的酪氨酸残基被磷酸化，并使用它们作为活性成分来致癌和侵袭癌症。或者，其涉及用于诊断转移的诊断剂和用于抑制癌症的发生，侵袭，转移或增殖的治疗剂。[选择图]无

(43) 公開日 平成17年4月7日(20)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード(参照)
C07K 16/18	C07K 16/18 ZNA	2G045
A61K 39/395	A61K 39/395 E	4B024
A61P 35/00	A61K 39/395 T	4B064
C12N 5/10	A61P 35/00	4B065
C12N 15/02	G01N 33/15 Z	4C085
	審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 30 頁) 最終	

(21) 出願番号	特願2003-323624 (P2003-323624)	(71) 出願人	00001029
(22) 出願日	平成15年9月16日(2003.9.16)		協和醱酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1
		(71) 出願人	590001452 国立がんセンター総長 東京都中央区築地5丁目1番1号
		(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 聡
		(74) 代理人	100101904