

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5916017号
(P5916017)

(45) 発行日 平成28年5月11日(2016.5.11)

(24) 登録日 平成28年4月15日(2016.4.15)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C O 7 K	16/18	(2006.01)	C O 7 K	16/18	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N	33/53	V

請求項の数 7 (全 50 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-512681 (P2012-512681)
 (86) (22) 出願日 平成23年4月28日 (2011.4.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2011/002520
 (87) 国際公開番号 W02011/135869
 (87) 国際公開日 平成23年11月3日 (2011.11.3)
 審査請求日 平成25年12月6日 (2013.12.6)
 (31) 優先権主張番号 特願2010-104033 (P2010-104033)
 (32) 優先日 平成22年4月28日 (2010.4.28)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

前置審査

(73) 特許権者 000001926
 塩野義製薬株式会社
 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号
 (73) 特許権者 504173471
 国立大学法人北海道大学
 北海道札幌市北区北8条西5丁目
 (74) 代理人 100113789
 弁理士 杉田 健一
 (72) 発明者 西村 紳一郎
 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大
 学法人北海道大学内
 (72) 発明者 内藤 正一
 大阪府豊中市二葉町3丁目1番1号 塩野
 義製薬株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規なMUC1抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

MUC1のがん関連構造に対するMUC1の正常組織関連構造の交差反応性比が40倍以上である、抗体またはその抗原結合性断片であって、該正常組織関連構造は、Neu5Ac₂Gal₁3[GlcNAc₁6]GalNAc-R、Neu5Ac₂Gal₁3[Gal₁4GlcNAc₁6]GalNAc-RおよびNeu5Ac₂Gal₁3[Neu5Ac₂Gal₁4GlcNAc₁6]GalNAc-Rからなる群より選択され、該がん関連構造は、Neu5Ac₂GalNAc-R、Gal₁3[Neu5Ac₂6]GalNAc-R、およびNeu5Ac₂Gal₁3[Neu5Ac₂6]GalNAc-Rからなる群より選択され、ここで、Neu5AcはN-アセチルノイラミン酸であり、Galはガラクトースであり、GlcNAcは、N-アセチルグルコサミンであり、GalNAcはN-アセチルガラクトサミンであり、Rは非糖部分であり、かつ、免疫グロブリン重鎖可変領域(VH)ドメインおよび免疫グロブリン軽鎖可変領域(VL)ドメインを含む少なくとも1つの抗原結合部位を有しており、該重鎖可変領域ドメインは、その配列中に、超可変領域CDR1、CDR2、CDR3を含み、CDR1は、SHDMS(配列番号4)からなり、CDR2は、AINS DGDNTYYPDTMER(配列番号5)からなり、CDR3は、LTLRNWYFDV(配列番号6)からなり、該軽鎖可変領域ドメインは、その配列中に、超可変領域CDR1'、CDR2'、CDR3'を含み、CDR1'は、KSSQSLLYSTNQQLA(配列番号7)からな

り、CDR 2' は、WASTRES (配列番号 8) からなり、CDR 3' は、QQYYRY PPT (配列番号 9) からなる、抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 2】

配列番号 2 および 3 を有する、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の抗体またはその抗原結合性断片を含む医薬組成物。

【請求項 4】

抗がん剤である、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

請求項 1 または 2 に記載の抗体またはその抗原結合性断片を含む、診断キット。

10

【請求項 6】

請求項 1 または 2 に記載の抗体またはその抗原結合性断片をコードする核酸分子。

【請求項 7】

請求項 1 または 2 に記載の抗体またはその抗原結合性断片を用いた、生物学的サンプル中の MUC 1 のがん関連構造の量を測定する工程、

および該生物学的サンプル中の MUC 1 のがん関連構造の量が健常人由来の生物学的サンプル中の MUC 1 のがん関連構造の量と比べて多いと認められる場合にがん患者由来の生物学的サンプルであると判定する工程、

を含むがん患者由来の生物学的サンプルを選別する方法。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体分野の技術に関する。より特定すると、ムチン - 1 に対する抗体およびこれを用いたがん治療技術に関する。

【背景技術】

【0002】

ムチンの一種であるムチン - 1 (Mucin 1、本明細書以下 MUC 1 と記載する) は、腫瘍関連抗原であり、多くの腺がんで発現している高分子量糖タンパク質である。このタンパク質に不可欠な膜糖タンパク質の細胞外ドメインは、セリン、トレオニンおよびプロリンに富む 20 個のアミノ酸コア配列 (本明細書以下「Tn20マー」とも称する; HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA (配列番号 1)) の 30 ~ 90 タンデム型反復から主として構成されることが知られている。また「Tn20マー」は、個体によって発現される反復数が異なっており、これらは遺伝的に決定され、サイズ多型を生じる。

30

【0003】

腫瘍 MUC 1 は、一般には低グリコシル化されていて、グリコシル化部位はしばしば異常型糖鎖伸長を有する。この異常型グリコシル化が正常な潜在的 (cryptic) ペプチドエpiteープの露出および新規炭水化物エpiteープの創出という結果を生じる。それらの高分子量 ($2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^7$ ダルトン) ならびに広範囲なグリコシル化のために、細胞膜ムチンは柔軟な杆状体として存在し、細胞表面から比較的大きな距離で突出している。したがって、ムチンは、多糖外皮の重要な成分を形成し、おそらく抗体と免疫系の細胞との細胞接触の第 1 のポイントと考えられる。

40

【0004】

過去に、精製した MUC 1 並びに MUC 1 に由来する合成ペプチド及びグリコペプチドに対する多数のモノクローナル抗体 (MAb) が製造されてきた (特許文献 1 - 5、非特許文献 1 - 2)。これらの抗体のほとんどの最小配列認識は、APDTRPAP (配列番号 10) 内に存在すると考えられる。MUC 1 タンデム型反復中の配列 SAPDTRP (配列番号 11) は、免疫優性 B 細胞エpiteープであり、配列 PDTRP (配列番号 12) は、タンデム型反復の T 細胞エpiteープに位置付けられている。これらの配列中に含まれるスレオニンについては、重度に O - グリコシル化されているため、MUC 1 に結合する抗体の選択性およびそのアフィニティに影響を及ぼすことが考えられる。しかし、上記の

50

いずれのモノクローナル抗体も、エピトープであるペプチドへの糖鎖結合の有無による差異は認識できたとしてもその糖鎖構造の差異までは認識できなかったため、がん細胞に対する選択性が充分とは言えなかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特許第3698370号明細書

【特許文献2】特表2002-502621公報

【特許文献3】特表2003-519096公報

【特許文献4】米国特許出願公開2006/0292643

【特許文献5】特表2010-505775公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Cancer Immunol Immunother 55: 1337-1347 (2006)

【非特許文献2】Tumor Biology Vol. 21, No. 4, 197-210, (2000)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、がん細胞で高発現する糖鎖構造を有するMUC1細胞に特異性を有する抗体を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

上記課題は、本発明者らが、STn型糖鎖(化合物番号4)を付加したペプチド(HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA(配列番号1)のアミノ酸配列に従ったエピトープを抗原として用いて動物を免疫することによって得られた抗体が、複数の種類からなるがん特異的な糖鎖に特異性を有しており、ひいてはMUC1を発現するがん細胞に対する特異性が従来の抗体よりも顕著に高いことを見出したことによって、解決した。

【0009】

別の局面において、本発明は、MUC1のがん関連構造に対する特異性が、MUC1の正常組織関連構造に対するものに比べ40倍以上である、抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を提供する。

【0010】

より特定すると、本発明は、MUC1のがん関連構造に対するMUC1の正常組織関連構造の交差反応性比が40倍以上である、抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子であって、該正常組織関連構造は、Neu5Ac₂Gal₁3[GlcNAc₁6]GalNAc-R、Neu5Ac₂Gal₁3[Gal₁4GlcNAc₁6]GalNAc-RおよびNeu5Ac₂Gal₁3[Neu5Ac₂3Gal₁4GlcNAc₁6]GalNAc-Rからなる群より選択され、該がん関連構造は、Neu5Ac₂6GalNAc-R<本明細書におけるSTn(化合物4)に対応する。>、Gal₁3[Neu5Ac₂6]GalNAc-R<本明細書におけるST2-6(化合物10)に対応する。Neu5Ac₂3Gal₁3[Neu5Ac₂6]GalNAc-R<本明細書におけるdST(化合物11)に対応する。>からなる群より選択され、ここで、Neu5AcはN-アセチルノイラミン酸であり、Galはガラクトースであり、GlcNAcは、N-アセチルグルコサミンであり、GalNAcはN-アセチルガラクトサミンであり、Rは非糖部分である、抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を提供する。

【0011】

10

20

30

40

50

別の実施形態において、本発明の抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子のがん関連構造への特異性は、STn（化合物4）に対する交差反応性によって表現することができる。交差反応性は、（STn（化合物4）に対するIC50/比較する糖鎖構造に対するIC50）×100（%）の計算式で求められる。1つの実施形態において、本発明の抗体は、がん関連構造のNeu5Ac₂6GalNAc-R（100%）に対して、前記正常組織関連構造のいずれについてもその交差反応性が約2%以下であり、50倍以上の特異性を有することが示される。

【0012】

さらに別の局面では、本発明は、がん細胞に対する特異性が正常細胞に対するものより少なくとも20倍強い抗MUC1抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を提供する。

10

【0013】

1つの実施形態として、本発明は、乳がん細胞に対する特異性が乳腺上皮細胞に対するものより約70倍強い抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を提供する。

【0014】

1つの実施形態として、本発明は、MUC1のがん関連構造Neu5Ac₂6GalNAc-Rに対する前記正常組織関連構造の交差反応性比が50倍以上である、抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を提供する。

【0015】

1つの実施形態として、本発明は、FACSによる細胞への結合評価において、蛍光シグナルシフトで特異性を評価したときの、T-47D細胞に対する特異性が184A1細胞に対するものより100倍以上強い、抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を提供する。

20

【0016】

さらに別の局面では、本発明は、Tn20マー（あるいは、配列番号1で示されるアミノ酸）のタンデムリピート依存性が低いことを特徴とする、抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を提供する。ここで、依存性の低さは、Tn20マービオチンを用いた場合の450nmの吸光度（A20）と、Tn100マービオチンを用いた場合の450nmの吸光度（A100）の比（A100/A20）が2以下であり、好ましくは、1.5倍以下であることが一つの特徴でありうる。

30

【0017】

さらに特定の実施形態では、本発明は、免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（VH）および免疫グロブリン軽鎖（VL）を含む少なくとも1つの抗原結合部位を有する抗体であって、該重鎖可変ドメインは、その配列中に、超可変領域CDR1、CDR2、CDR3を含み、CDR1は、SHDMS（配列番号4）またはその改変体からなり、CDR2は、AINSDGDNTYYPDTMER（配列番号5）またはその改変体からなり、CDR3は、LTLRNWYFDV（配列番号6）またはその改変体からなり、該軽鎖可変ドメインは、その配列中に、超可変領域CDR1'、CDR2'、CDR3'を含み、CDR1'は、KSSQSLLYSTNQQLYLA（配列番号7）またはその改変体からなり、CDR2'は、WASTRES（配列番号8）またはその改変体からなり、CDR3'は、QQYRYPPPT（配列番号9）またはその改変体からなる、抗MUC1抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を提供する。

40

【0018】

より特定すると、本発明は、抗体12D10の全長配列、あるいは配列番号2および3を有する抗体、その抗原結合性断片に関する。

【0019】

さらに別の局面では、本発明は、本発明の抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を含む医薬に関する。

【0020】

さらに別の局面では、本発明の医薬は、抗がん剤である。

50

【 0 0 2 1 】

さらに別の局面では、本発明は、本発明の抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子をコードする核酸分子（たとえば、DNAなど）を提供する。

【 0 0 2 2 】

さらに別の局面では、本発明は、本発明の抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を含む診断剤に関する。

【 0 0 2 3 】

さらに別の局面では、本発明は、本発明の抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を用いた、がんの診断方法に関する。

【 0 0 2 4 】

さらに別の局面では、本発明は、本発明の抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を含む診断キットに関する。

【 0 0 2 5 】

さらに別の局面では、本発明は、本発明の抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子であって、標識されたものに関する。

【 0 0 2 6 】

さらに別の局面では、本発明は、本発明の抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を用いる、イムノアッセイに関する。

【 0 0 2 7 】

さらに別の局面では、本発明は、本発明の抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を用いる、MUC1またはその関連分子の検出方法に関する。

【 0 0 2 8 】

さらに別の局面では、本発明は、本発明の抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を用いた、生物学的サンプル中のMUC1のがん関連構造の量を測定する工程、および該生物学的サンプル中のMUC1のがん関連構造の量が健常人由来の生物学的サンプル中のMUC1のがん関連構造の量と比べて多いと認められる場合にがん患者由来の生物学的サンプルであると判定する工程、を含むがん患者由来の生物学的サンプルを選別する方法に関する。

【 0 0 2 9 】

本発明の抗体は、タンデム依存性が低いが、これは以下の理由で有用である。すなわち、MUC1には、多種の糖鎖が付いているが、タンデムリピート依存性の低い抗体の方がMUC1にその繰り返し構造の回数に依存することなく結合することが可能となるので、MUC1の検出能が優れていることが予想されるからである。

【 0 0 3 0 】

すなわち、タンデム依存性が高い抗体は、エピトープ構造()が繰り返される部分にしか強く結合できないが()への親和性は高いが、()への親和性は低い(ここで、()、()、および()は互いに異なりそれぞれとは異なる別のエピトープ構造を示す。)、タンデム依存性が低い抗体は、エピトープ構造()が1つでも強く結合できる()への親和性は高く、()への親和性も高い)と説明することができる。

【 0 0 3 1 】

これらのすべての局面において、本明細書に記載される各々の実施形態は、適用可能である限り、他の局面において適用されることが理解される。

【 発明の効果 】

【 0 0 3 2 】

正常細胞にあまり結合せずのがん細胞に対して従来にない高い特異性または選択性で結合する抗体が提供された。この抗体は、さらにがん細胞殺傷能力すら有し得、副作用の少ない抗がん剤として期待される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 3 】

10

20

30

40

50

【図1a】MUC1抗体(12D10)とがん細胞で高発現する糖鎖構造(STn(DT* R) - 20(表1の化合物番号4)の結合に対する各種MUC1糖ペプチドによる置換曲線を示す。縦軸は、各種MUC1糖ペプチドを添加しない場合の450nmの吸光度を100%とした時の、各種MUC1糖ペプチド添加した場合の450nmの吸光度の割合を示し、横軸は各種MUC1糖ペプチドの濃度を示す。いずれの図においても、黒菱形は、STnを示し、白四角は、ST2-6を示し、黒三角はdSTを示し、白丸は23ST6Lを示し、白三角は2,3ST6SLを示す。

【図1b】MUC1抗体(Pankomab)とがん細胞で高発現する糖鎖構造(STn(DT* R) - 20(表1の化合物番号4)の結合に対する各種MUC1糖ペプチドによる置換曲線を示す。縦軸は、各種MUC1糖ペプチドを添加しない場合の450nmの吸光度を100%とした時の、各種MUC1糖ペプチド添加した場合の450nmの吸光度の割合を示し、横軸は各種MUC1糖ペプチドの濃度を示す。いずれの図においても、黒菱形は、STnを示し、白四角は、ST2-6を示し、黒三角はdSTを示し、白丸は23ST6Lを示し、白三角は2,3ST6SLを示す。

【図1c】MUC1抗体(VU-2G7)とがん細胞で高発現する糖鎖構造(STn(DT* R) - 20(表1の化合物番号4)の結合に対する各種MUC1糖ペプチドによる置換曲線を示す。縦軸は、各種MUC1糖ペプチドを添加しない場合の450nmの吸光度を100%とした時の、各種MUC1糖ペプチド添加した場合の450nmの吸光度の割合を示し、横軸は各種MUC1糖ペプチドの濃度を示す。いずれの図においても、黒菱形は、STnを示し、白四角は、ST2-6を示し、黒三角はdSTを示し、白丸は23ST6Lを示し、白三角は2,3ST6SLを示す。

【図1d】MUC1抗体(SM3)とがん細胞で高発現する糖鎖構造(STn(DT* R) - 20(表1の化合物番号4)の結合に対する各種MUC1糖ペプチドによる置換曲線を示す。縦軸は、各種MUC1糖ペプチドを添加しない場合の450nmの吸光度を100%とした時の、各種MUC1糖ペプチド添加した場合の450nmの吸光度の割合を示し、横軸は各種MUC1糖ペプチドの濃度を示す。いずれの図においても、黒菱形は、STnを示し、白四角は、ST2-6を示し、黒三角はdSTを示し、白丸は23ST6Lを示し、白三角は2,3ST6SLを示す。

【図2】抗体12D10のMUC1タンデムリピート依存性を示す。縦軸は、450nmの吸光度を示し、横軸は、MUC1糖ペプチドの種類を示す。左(白ぬき)からそれぞれ、20マー(STn-20mer)、40マー(STn-40mer)、60マー(STn-60mer)、80マー(STn-80mer)、および100マー(STn-100mer)(右端、黒塗り)を示す。

【図3】がん細胞膜表面に発現するMUC1タンパク質と12D10抗体が結合するかどうかを、FACSにて調べた実験結果を示す。FACS Ariaで解析した結果を示す。左は、乳がん細胞T-47Dに対する結果を示し、中央は、ヒト肺がん培養細胞Calu-3細胞を示し、右は、コントロールである乳腺上皮細胞184Aに対する結果を示す。点線はコントロールIgGを示し、実線は、12D10抗体を示す。この結果から、12D10抗体は、乳がん細胞および肺がん細胞と強く反応するが、乳腺上皮細胞とは、ほとんど反応しないことが示された。

【図4】抗体12D10の可変領域のアミノ酸配列(配列番号2および3)を示す。上2列は重鎖(Heavy Chain; 配列番号2)を示し、下2列は軽鎖(Light Chain; 配列番号3)を示す。下線は各CDR部位を示す。

【図5】抗体12D10を用いたサンドイッチイムノアッセイによるMUC1の定量的ための標準曲線を示す。

【発明を実施するための形態】

【0034】

以下、本発明に関して、発明の実施の形態を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現(例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など、他の言語における対応する冠詞、形容詞など)は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが

10

20

30

40

50

理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

【0035】

（用語の定義）

本明細書において「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。この用語はまた、複数のポリペプチド鎖の複合体へとアSEMBLされたものを包含し得る。この用語はまた、天然または人工的に改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変（例えば、標識成分との結合体化）。この定義にはまた、例えば、アミノ酸の1または2以上のアナログを含むポリペプチド（例えば、非天然のアミノ酸などを含む）、ペプチド様化合物（例えば、ペプチド）および当該分野において公知の他の改変が包含される。

10

【0036】

本明細書において、「アミノ酸」は、本発明の目的を満たす限り、天然のもので非天然のものでよい。

20

【0037】

本明細書において「核酸」はまた、遺伝子、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチド、およびポリヌクレオチドと互換可能に使用される。特定の核酸配列はまた、「スプライス改変体」を包含する。同様に、核酸によりコードされた特定のタンパク質は、その核酸のスプライス改変体によりコードされる任意のタンパク質を暗黙に包含する。その名が示唆するように「スプライス改変体」は、遺伝子のオルタナティブスプライシングの産物である。転写後、最初の核酸転写物は、異なる（別の）核酸スプライス産物が異なるポリペプチドをコードするようにスプライスされ得る。スプライス改変体の産生機構は変化するが、エキソンのオルタナティブスプライシングを含む。読み越し転写により同じ核酸に由来する別のポリペプチドもまた、この定義に包含される。スプライシング反応の任意の産物（組換え形態のスプライス産物を含む）がこの定義に含まれる。あるいは、対立遺伝子変異体もこの範囲内に入る。

30

【0038】

本明細書において「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーをいう。この用語はまた、「オリゴヌクレオチド誘導体」または「ポリヌクレオチド誘導体」を含む。「オリゴヌクレオチド誘導体」または「ポリヌクレオチド誘導体」とは、ヌクレオチドの誘導体を含むか、またはヌクレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをいい、互換的に使用される。そのようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、例えば、2'-O-メチル-リボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスホロアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン（phenoxazine-modified cytosine）で置換さ

40

50

れたオリゴヌクレオチド誘導体、DNA中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体およびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体などが例示される。他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体（例えば、縮重コドン置換体）および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、1またはそれ以上の選択された（または、すべての）コドンの3番目の位置が混合塩基および/またはデオキシノシン残基で置換された配列を作成することにより達成され得る（Batzerら、Nucleic Acid Res. 19:5081(1991); Ohtsukaら、J. Biol. Chem. 260:2605-2608(1985); Rossoliniら、Mol. Cell. Probes 8:91-98(1994)）。

10

【0039】

本明細書において「ヌクレオチド」は、天然のものでも非天然のものでも目的とする機能が保持される限りいずれでもよい。

【0040】

アミノ酸は、その一般に公知の3文字記号か、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨される1文字記号のいずれかにより、本明細書中で言及され得る。ヌクレオチドも同様に、一般に認知された1文字コードにより言及され得る。

【0041】

本明細書において「糖鎖」とは、単位糖（単糖および/またはその誘導体）が1つ以上連なってできた化合物をいう。単位糖が2つ以上連なる場合は、各々の単位糖同士の間は、グリコシド結合による脱水縮合によって結合する。このような糖鎖としては、例えば、生体中に含有される多糖類（グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、キシロース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、シアル酸ならびにそれらの複合体および誘導体）の他、分解された多糖、糖タンパク質、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、糖脂質などの複合生体分子から分解または誘導された糖鎖など広範囲なものが挙げられるがそれらに限定されない。したがって、本明細書では、糖鎖は、「糖」、「多糖（ポリサッカリド）」、「糖質」、「炭水化物」と互換可能に使用され得る。また、特に言及しない場合、本明細書において「糖鎖」は、糖鎖および糖鎖含有物質の両方を包含することがある。代表的には、約20種類の単糖（グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、キシロース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、シアル酸ならびにそれらの複合体および誘導体など）が鎖状につながった物質で、生体の細胞内外のタンパク質または脂質に付いている。単糖の配列によって機能が異なり、通常は複雑に枝分かれしていて、人体には数百種類以上の多様な構造の糖鎖があると予想されており、さらに、人体において有用な構造は数万種類以上あると考えられている。細胞間での分子・細胞認識機能などタンパク質や脂質が生体内で果たす高次機能に関係していると見られているが、そのメカニズムは未解明の部分が多い。核酸、タンパク質に次ぐ第3の生命鎖として現在のライフサイエンスで注目されている。とりわけ、細胞認識におけるリガンド（情報分子）としての糖鎖の機能が期待され、その高機能材料開発への応用が研究されている。

20

30

40

【0042】

本明細書において「糖鎖基」とは、糖鎖が別の基と結合したときに付される名称である。糖鎖基は場合に応じて一価または二価のものを指す。例えば、糖鎖基としては、シアルルイスX基、N-アセチルラクトサミン基、1-6マンノピオース基が挙げられる。

【0043】

本明細書で使用される糖の略称のうち、Neu5AcはN-アセチルノイラミン酸であり、Galはガラクトースであり、GlcNAcは、N-アセチルグルコサミンであり、GalNAcはN-アセチルガラクトサミンであり、Rは非糖部分（たとえば、ペプチド、タンパク質、脂質など）である。

50

【0044】

また、糖鎖の特定の名称については、以下のように定義される。

2, 3 ST 6 G : Neu 5 Ac 2 3 Gal 1 3 [GlcNAc 1 6] GalNAc - R、

2, 3 ST 6 L : Neu 5 Ac 2 3 Gal 1 3 [Gal 1 4 GlcNAc 1 6] GalNAc - R

2, 3 ST 6 SL : Neu 5 Ac 2 3 Gal 1 3 [Neu 5 Ac 2 3 Gal 1 4 GlcNAc 1 6] GalNAc - R

2, 3 ST : Neu 5 Ac 2 3 Gal 1 3 GalNAc - R

STn : Neu 5 Ac 2 6 GalNAc - R

ST2 - 6 : Gal 1 3 [Neu 5 Ac 2 6] GalNAc - R

dST : Neu 5 Ac 2 3 Gal 1 3 [Neu 5 Ac 2 6] GalNAc - R

Tn : GalNAc - R

T : Gal 1 3 GalNAc - R

【0045】

本明細書において遺伝子の「相同性」とは、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、ある2つの遺伝子の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。2種類の遺伝子が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、または核酸の場合ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。2つの遺伝子配列を直接比較する場合、その遺伝子配列間でDNA配列が、代表的には少なくとも80%同一である場合、好ましくは少なくとも90%同一である場合、より好ましくは少なくとも95%同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。

【0046】

本明細書では、アミノ酸配列および塩基配列の類似性、同一性および相同性の比較は、配列分析用ツールであるBLASTを用いてデフォルトパラメータを用いて算出される。同一性の検索は例えば、NCBIのBLAST 2.2.9 (2004.5.12 発行)を用いて行うことができる。本明細書における同一性の値は通常は上記BLASTを用い、デフォルトの条件でアラインした際の値をいう。ただし、パラメーターの変更により、より高い値が出る場合は、最も高い値を同一性の値とする。複数の領域で同一性が評価される場合はそのうちの最も高い値を同一性の値とする。

【0047】

本明細書において、「対応する」遺伝子とは、ある種において、比較の基準となる種における所定の遺伝子と同様の作用を有するか、または有することが予測される遺伝子をいい、そのような作用を有する遺伝子が複数存在する場合、進化学的に同じ起源を有するものをいう。従って、ある遺伝子(例えば、MUC1)に対応する遺伝子は、その遺伝子のオルソログであり得る。したがって、ヒトの遺伝子に対応する遺伝子は、他の動物(マウス、ラット、ブタ、ウサギ、モルモット、ウシ、ヒツジなど)においても見出すことができる。そのような対応する遺伝子は、当該分野において周知の技術を用いて同定することができる。したがって、例えば、ある動物における対応する遺伝子は、対応する遺伝子の基準となる遺伝子の配列をクエリ配列として用いてその動物(例えば、マウス、ラット、ブタ、ウサギ、モルモット、ウシ、ヒツジなど)の配列データベースを検索することによって見出すことができる。

【0048】

本明細書において「フラグメント」または「断片」とは、全長のポリペプチドまたはポリヌクレオチド(長さがn)に対して、1~n-1までの配列長さを有するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう。断片の長さは、その目的に応じて、適宜変更することができ、例えば、その長さの下限としては、ポリペプチドの場合、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50およびそれ以上のアミノ酸が挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ(例えば、11など)もまた、下限

10

20

30

40

50

として適切であり得る。また、ポリヌクレオチドの場合、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100およびそれ以上のヌクレオチドが挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。本明細書において、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの長さは、上述のようにそれぞれアミノ酸または核酸の個数で表すことができるが、上述の個数は絶対的なものではなく、同じ機能を有する限り、上限または下限としての上述の個数は、その個数の上下数個（または例えば上下10%）のものも含むことが意図される。そのような意図を表現するために、本明細書では、個数の前に「約」を付けて表現することがある。しかし、本明細書では、「約」のあるなしはその数値の解釈に影響を与えないことが理解されるべきである。本明細書において有用な断片の長さは、その断片の基準となる全長タンパク質の機能のうち少なくとも1つの機能が保持されているかどうかによって決定され得る。

10

【0049】

本明細書において、「改変体」、「改変配列」または「アナログ」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドなどの物質に対して、一部が変更されているものをいう。そのような改変体としては、置換改変体、付加改変体、欠失改変体、短縮（truncated）改変体、対立遺伝子変異体などが挙げられる。対立遺伝子（allele）とは、同一遺伝子座に属し、互いに区別される遺伝的改変体のことをいう。従って、「対立遺伝子変異体」とは、ある遺伝子に対して、対立遺伝子の関係にある改変体をいう。「種相同体またはホモログ（homolog）」とは、ある種の中で、ある遺伝子とアミノ酸レベルまたはヌクレオチドレベルで、相同性（好ましくは、80%以上の相同性、より好ましくは、90%以上の相同性）を有するものをいう。そのような種相同体を取得する方法は、本明細書の記載から明らかである。

20

【0050】

本明細書中において、機能的に等価なポリペプチドを作製するために、アミノ酸の置換のほかに、アミノ酸の付加、欠失、または修飾もまた行うことができる。アミノ酸の置換とは、もとのペプチドを1つ以上、例えば、1~10個、好ましくは1~5個、より好ましくは1~3個のアミノ酸で置換することをいう。アミノ酸の付加とは、もとのペプチド鎖に1つ以上、例えば、1~10個、好ましくは1~5個、より好ましくは1~3個のアミノ酸を付加することをいう。アミノ酸の欠失とは、もとのペプチドから1つ以上、例えば、1~10個、好ましくは1~5個、より好ましくは1~3個のアミノ酸を欠失させることをいう。アミノ酸修飾は、アミド化、カルボキシル化、硫酸化、ハロゲン化、アルキル化、リン酸化、水酸化、アシル化（例えば、アセチル化）などを含むが、これらに限定されない。置換、または付加されるアミノ酸は、天然のアミノ酸であってもよく、非天然のアミノ酸、またはアミノ酸アナログでもよいが、天然のアミノ酸が好ましい。

30

【0051】

このようなポリペプチドをコードする核酸は、周知のPCR法により得ることができ、化学的に合成することもできる。これらの方法に、例えば、部位特異的変位誘発法、ハイブリダイゼーション法などを組み合わせてもよい。

【0052】

40

本明細書において、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの「置換、付加および/または欠失」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して、それぞれアミノ酸もしくはその代替物、またはヌクレオチドもしくはその代替物が、置き換わること、付け加わること、または取り除かれることをいう。このような置換、付加および/または欠失の技術は、当該分野において周知であり、そのような技術の例としては、部位特異的変異誘発技術などが挙げられる。基準となる核酸分子またはポリペプチドにおけるこれらの変化は、目的とする機能（例えば、抗MUC1抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子においてはMUC1への結合など）が保持される限り、この核酸分子の5'末端もしくは3'末端で生じ得るか、またはこのポリペプチドを示すアミノ酸配列のアミノ末端部位もしくはカルボキシ末端部位で生じ得るか、またはそれらの末端部位の間のどこにで

50

も生じ得、基準配列中の残基間で個々に散在する。置換、付加または欠失は、1つ以上であれば任意の数でよく、そのような数は、その置換、付加または欠失を有する改変体において目的とする機能（例えば、MUC1への結合など）が保持される限り、制限されない。例えば、そのような数は、1または数個であり得、そして好ましくは、全体の長さの5%以内、または25個以下などであり得る。

【0053】

本明細書において「類似するアミノ酸」とは、保存的置換の関係にあるアミノ酸をいい、以下のアミノ酸が該当する。そして、本発明の特定の配列（たとえば、12D10）から、以下の置換が行われた改変体もまた、本発明の範囲内に入ることが理解される。

A：G，I，V，L

C：M（含Sアミノ酸）

D：N、QまたはE

E：N、QまたはD

F：Y、Aなど

G：A

H：Wなど

I：A，L，V，（G）

K：R

L：A，I，V，（G）

M：Sなど

N：E、DまたはQ

P：HyP

Q：N、EまたはD

R：K

S：T、Y

T：S，Y

V：I，L，A、（G）

W：H

Y：F、S，T

これらのアミノ酸の間の置換は、本明細書において「保存的置換」ともいう。

【0054】

本明細書において、生物学的サンプル中のMUC1のがん関連構造の「量」とは、対象となる物質の物理量を直接示す尺度（例えば、モル量、重量等）をいい、生物学的サンプル中のMUC1のがん関連構造の「レベル」とは、対象となる物質の物理量を反映した他の尺度（例えば、免疫学的手法での量以外の指標（例えば、吸光度等）で表示されうる）をいう。生物学的サンプル中のMUC1のがん関連構造のレベル等は、物理化学的手法などを用いて直接量を測定してもよく、免疫学的手法などを用いて間接的に量を測定してもよく、あるいは、量が不明であっても、存在量を反映するレベル（例えば、免疫学的手法での量以外の指標で表示されうる）で表示することによってスクリーニングを実施することができる。

【0055】

本明細書において「健常人」とは、正常で健康なヒト、またはがんに罹患していないことが判明しているヒトをいう。

【0056】

本明細書において「MUC1」とは、ムチンの一種であるムチン1のタンパク質またはその遺伝子、DNA、核酸をいう。腫瘍関連抗原であり、多くの腺がんで発現する高分子量糖タンパク質である。このタンパク質は、不可欠な膜糖タンパク質の細胞外ドメインは、セリン、トレオニンおよびプロリンに富む20個のアミノ酸コア配列（本明細書以下「Tn20マー」とも称する；HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA（配列番号1）の30～90タンデム型反復から主として構成されることが示されている。「Tn20マ

10

20

30

40

50

ー」は、個体によって発現される反復数は、遺伝的に決定され、サイズ多型を生じる。

【0057】

(抗体)

本明細書において「抗体」とは、免疫反応において、抗原の刺激によって生体内でつくられ、抗原と特異的に結合したり反応したりするタンパク質またはそれらと同じ配列を有するものを化学合成等で生産したものを総称していう。実体は免疫グロブリンであり、A bとも称する。

【0058】

本明細書において抗体の「抗原結合性断片」とは、ある抗体について、その抗体の抗原と同じ抗原に対して結合性を有する断片をいう。そのような「抗原結合性断片」の範囲に入るかどうかは、本明細書に記載される親和性のアッセイによって評価することができる。本明細書中においては、そのような親和性は、抗体に対する標識MUC1分子の結合量を50%阻害する濃度(IC₅₀値)を指標として示すことができ、IC₅₀値は、例えばlogistic曲線による回帰モデル(Rodbardら、Symposium on RIA and related procedures in medicine, P165, Int. Atomic Energy Agency, 1974)で算出することができる。

【0059】

本明細書において「MUC1結合分子」とは、単独または他の分子と関連して、いずれかでMUC1抗原に結合し得る任意の分子をいう。したがって、MUC1結合分子には定義上抗体および抗体の抗原性結合断片以外の結合分子(アプタマー等)、抗体および抗体の抗原性結合断片等の結合部分を含む他の分子(例えば、抗体複合分子、抗原性結合断片複合分子またはアプタマー結合分子)等が含まれることが理解される。このような結合反応は、抗体の親和性の試験と同様の試験で判定することができる。本明細書では、「抗体複合分子」または「抗原性結合断片複合分子」は、抗体または抗原結合性断片と他の分子(例えば、タンパク質、ペプチド、ヌクレオチド、糖、脂質等)が結合した分子をいう。好ましくは、抗体複合分子または抗原性結合断片複合分子は、もとの抗体または抗原性結合断片の結合性を保持している。

【0060】

本明細書において「抗MUC1抗体」および「MUC1抗体」は、交換可能に使用され、MUC1に対して惹起されたか、あるいは、それと同等の結合能を有する抗体をいう。

【0061】

本明細書において「抗体依存的細胞傷害活性」とは、抗体に依存して細胞を殺傷する能力をいう。この能力を測るためには、たとえば、本明細書において記載されるクロミウム遊離試験などを用いることができる。

【0062】

本明細書において「正常組織関連構造」とは、がん化していない正常細胞または正常組織において高発現している構造(例えば、糖鎖構造)をいう。この構造は、がん組織やがん細胞において発現量が低いことが知られている。このような正常組織関連構造の糖鎖としては、たとえば、Neu5Ac₂Gal₁3[GlcNAc₁6]GalNAc-R、Neu5Ac₂Gal₁3[Gal₁4GlcNAc₁6]GalNAc-R(2,3ST6L)およびNeu5Ac₂Gal₁3[Neu5Ac₂Gal₁4GlcNAc₁6]GalNAc-R(2,3ST6SL)などをあげることができる。

【0063】

本明細書において「がん関連構造」とは、がん組織またはがん細胞において高発現している構造(例えば、糖鎖構造)をいう。この構造は、正常組織や正常細胞において発現量が低いことが知られている。このようながん関連構造の糖鎖としては、たとえば、Neu5Ac₂6GalNAc-R<STn(化合物4)に対応>、Gal₁3[Neu5Ac₂6]GalNAc-R<ST2-6(化合物10)に対応>、Neu

10

20

30

40

50

5 Ac 2 3 Gal 1 3 [Neu 5 Ac 2 6] Gal NA c - R < d S T (化合物 1 1) に対応 >、Neu 5 Ac 2 3 Gal 1 3 Gal NA c - R (2 , 3 S T) , Gal NA c - R (T n) および Gal 1 3 Gal NA c - R (T) などを挙げることができる。ここで、Neu 5 Ac は N - アセチルノイラミン酸であり、Gal はガラクトースであり、Glc NA c は、N - アセチルグルコサミンであり、Gal NA c は N - アセチルガラクトサミンであり、R は非糖部分である。

【 0 0 6 4 】

本明細書において正常組織関連構造に比べたがん関連構造に対する「特異性」とは、正常組織関連構造に比べて、がん関連構造により親和性の高い性質をいう。

【 0 0 6 5 】

このような特異性は、交差反応性比によって表現することができる。交差反応性比は、(がん関連構造 S T n に対する IC_{50} / 比較する糖鎖構造に対する IC_{50}) $\times 100$ (%) の計算式で求められる。本明細書において特異性があるとは、例えば、2 倍以上の差があることをいう。あるいは、直接交差反応性比を比較した場合、交差反応性比が、例えば、約 2 倍以上、約 3 倍以上、約 4 倍以上、約 5 倍以上、約 10 倍以上、約 20 倍以上、約 30 倍以上、約 40 倍以上、約 50 倍以上、あるいはそれより高い倍率でありうる。本明細書では、特定の実施形態では、MUC 1 のがん関連構造 Neu 5 Ac 2 6 Gal NA c - R に対する前記正常組織関連構造の交差反応性比で特異性を比較することができる。

【 0 0 6 6 】

あるいは、このような特異性は、FACS による細胞への結合評価において、蛍光シグナルシフトで特異性を評価することによって比較することができる。例えば、特定の実施形態では、FACS による細胞への結合評価において、蛍光シグナルシフトで特異性を評価したときの、T - 47D 細胞に対する特異性が 184A1 細胞に対するものより約 2 倍以上強い、約 3 倍以上強い、約 4 倍以上強い、約 5 倍以上強い、約 10 倍以上強い、約 20 倍以上強い、約 30 倍以上強い、約 40 倍以上強い、約 50 倍以上強い、あるいはそれより高い倍率のものを挙げることができる。

【 0 0 6 7 】

また、本明細書において IC_{50} とは、50% 阻害濃度のことで、ある抗体と抗原の結合を 50% 阻害するのに必要な濃度をいう。 IC_{50} 値は logistic 曲線による回帰モデル (Rodbard ら、Symposium on RIA and related procedures in medicine, P165, Int. Atomic Energy Agency, 1974) で算出することができる。

【 0 0 6 8 】

本明細書において「がん細胞」とは、腫瘍細胞と同じ意味で用いられ、悪性の細胞をいう。本発明が対象とする代表的ながん細胞としては、MUC 1 の発現細胞が挙げられる。固形腫瘍の約 75% は、MUC 1 を異常に発現することが知られている。MUC 1 は、90% 以上の乳がんの 90% 以上、前立腺がんの約 50%、および卵巣がん、結腸直腸がん、肺がんおよび膵臓がんでも高い割合で発現していることが知られている。MUC 1 を発現するがん細胞として具体的には、例えば、乳がん細胞の T - 47D 細胞や肺がん細胞である Calu - 3 細胞を挙げることができる。

【 0 0 6 9 】

本明細書において「正常細胞」とは、がん化していない細胞をいう。具体的には、例えば、MUC 1 を発現している正常細胞として知られている乳腺上皮細胞である 184A1 細胞や、MDA - MB - 231 細胞などを挙げることができる。

【 0 0 7 0 】

本明細書において「タンデムリピート依存性」とは、MUC 1 のタンデム構造のリピートが多いものほど抗体が強く結合する性質のことをいう。タンデムリピート依存性は、例えば、Tn20 マービオチンおよび Tn100 マービオチン (Tn20 マーを 5 回リピートさせたタンデム構造) に対する親和性の比によって表すことができる。たとえば、実施

10

20

30

40

50

例において記載されている方法によれば、 $Tn20$ マービオチンを用いた場合の 450 nm の吸光度($A20$)と、 $Tn100$ マービオチン(を用いた場合の 450 nm の吸光度($A100$))の比($A100/A20$)の値で表すことができる。

【0071】

本明細書において「タンデムリピート依存性が低い」とは、このタンデム構造の数にかかわらず(一つであっても)反応することができることを意味する。具体的には、前記の $A100/A20$ の値が2以下、好ましくは1.5以下である場合をさす。

【0072】

本明細書において免疫グロブリン「重鎖可変ドメイン(VH)」および「軽鎖可変(VL)ドメイン」とは、当該分野において通常用いられる意味で用いられる。免疫グロブリンは、基本構造は同じで2本のL鎖(軽鎖、light chain)と2本のH鎖(重鎖、heavy chain)とがS-S結合でつながり、H鎖はC末端側のFc(crySTALLIZABLE fragment)とN末端側のFab(antigen binding fragment)の2断片がヒンジ部(ちょうつがい部)で折れ曲ってつながり、全体としてY字形をとる。L鎖およびH鎖ともにN末端から約110個のアミノ酸(L鎖の約半分の長さ)の配列は、抗原特異性に依りて部分的に異なった配列の仕方をしている。この部分を可変部(可変領域、V部)とよび、抗原特異性の決定にはL鎖とH鎖の両方の可変部(VL 、 VH)が関係している。可変部以外の部分は各クラスあるいはサブクラスごとにほぼ一定であり、定常部(定常領域、constant region、C部)とよぶ。定常部は約110個のアミノ酸からなるポリペプチド単位(相同単位)がL鎖では一つ(CL)、H鎖では、IgG、IgA、IgDで3個($CH1$ 、 $CH2$ 、 $CH3$)、IgM、IgEで4個つながっていて、各単位あるいは向かいあった部位と結合して生じた部域をドメイン(domain)という。

【0073】

(抗体分子の表現方法、抗原結合性断片、結合分子)

本明細書では、格別に他の意味であると指示しない限り、抗体などの任意のポリペプチド鎖は、N終末端(N-terminal extremity)で開始しC終末端(C-terminal extremity)で終結するアミノ酸配列を有するものとして記載する。抗原結合部位が VH および VL ドメイン両方を含むとき、これらは同一ポリペプチド分子に位置し得るか、好ましくは、各ドメインは別の鎖に位置し得、この場合、 VH ドメインは免疫グロブリンすなわち抗体の重鎖またはその断片の一部であり、また VL は免疫グロブリンすなわち抗体の軽鎖またはその断片の一部である。

【0074】

本明細書において使用される「抗体または抗原結合性断片」の例には、B細胞またはハイブリドーマにより産生されるような抗体およびキメラ抗体、CDR移植抗体もしくはヒトの抗体またはその任意の断片、例えば $F(ab')_2$ およびFab断片および単鎖抗体が含まれる。したがって、本明細書において使用される「MUC1結合分子」の例には、これらのB細胞またはハイブリドーマにより産生されるような抗体およびキメラ抗体、CDR移植抗体もしくはヒトの抗体またはその任意の断片、例えば $F(ab')_2$ およびFab断片、単鎖抗体および単一ドメイン抗体に他の分子が結合したものなどが含まれることが理解される。

【0075】

単鎖抗体は、10から30アミノ酸、好ましくは15から25アミノ酸からなるペプチドリンカーにより共有結合する抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメインからなる。そのため、その構造は重鎖および軽鎖の定常部分を含まず、小さなペプチドスペーサーは全定常部分よりも抗原性が低いと考えられている。「キメラ抗体」とは、重鎖もしくは軽鎖またはその両方の定常領域がヒト等の特定動物由来である一方、重鎖および軽鎖の両方の可変ドメインはその特定動物以外(例えば、非ヒト)由来(例えば、マウス)であるか、またはその特定動物(例えば、ヒト)由来であるが、別のその特定動物(例えば、ヒト)抗体から誘導される抗体を意味する。「CDR移植抗体」とは、超可変部位領域(CDR)が、特定

10

20

30

40

50

動物に関していう場合、非特定動物（例えば、特定動物がヒトの場合、マウス）抗体または別の特定動物（例えば、ヒト）抗体のようなドナー抗体から誘導される一方、免疫グロブリンの他の部分すべてまたは実質的にすべて、例えば定常領域および可変ドメインの高保存部分、すなわち、フレームワーク領域が、アクセプター抗体、例えば、特定動物（例えば、ヒト）由来の抗体から誘導される抗体を意味する。しかし、CDR移植抗体は、フレームワーク領域中、例えば超可変領域に隣接するフレームワーク領域の一部にドナー配列の数アミノ酸を含む。「ヒト化抗体」とは、重鎖および軽鎖両方の定常および可変領域がすべてヒト由来であるか実質的にヒト由来配列と同一であり、必ずしも同一抗体由来である必要はなく、そしてマウス免疫グロブリン可変部分および定常部分の遺伝子がヒト対応物(counterpart)、例えば欧州特許0546073B1、米国特許5545806等において一般の用語で記載されるようなものにより置換えられるマウス産生抗体が含まれる抗体を意味する。

10

【0076】

したがって、好ましい抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子は、重鎖および軽鎖の可変ドメインはヒト由来であり、例えば、配列番号2および/または3の改変体（たとえば、1または数個のアミノ酸の置換・挿入、付加もしくは欠失を含むものが挙げられるがこれに限定されない。）において示される配列を有しうる。定常領域ドメインはまた、好ましくは、適当なヒト定常領域ドメイン、例えば、Kabata E. A. et al., US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Healthに記載されているものが含まれる。可変領域のアミノ酸配列をKabataらにより作成された抗体のアミノ酸配列のデータベース（「Sequence of Proteins of Immunological Interest」US Dept. Health and Human Services, 1983）にあてはめて、相同性を調べることによりCDR領域を見いだすことができる。CDR領域の配列は、本発明の所望する生物学的活性（たとえば、結合活性または中和活性）が保持される範囲内であれば、少なくとも1つの付加・挿入、置換または欠失による改変体も本発明に含まれる。また、各CDR領域との相同性が90～100%の配列であるものが挙げられる。

20

【0077】

本明細書において「抗体価(titer)」とは、血清反応において、抗血清の単位容量中に含まれている、抗原に対して結合する抗体量をいう。実際の測定は抗血清の希釈系列に対して一定量の抗原を加えて行い、測定値は反応の生じる終末点における希釈倍数であらわす。

30

【0078】

本明細書において「親和性(affinity)」とは抗体とその認識物質間の結合力をいう。本明細書中においては、抗体と抗原などその認識物質の解離定数を指標として親和性(K_D)を示される。親和性(K_D)の測定方法は、この分野の当業者にとって常識であり、たとえば、センサーチップを用いても求めることができる。

40

【0079】

本明細書において使用されるフレームワークは、任意の種類フレームワーク領域に関連し得るが、好ましくはヒト由来のものである。適当なフレームワーク領域は、Kabata E. A.らの文献を参照すれば選択できる。好ましい重鎖フレームワークは、ヒト重鎖フレームワークであり、例えば、配列番号2において示される抗MUC1抗体のフレームワークである。それは、配列番号2に示す配列から、上記文献を参照して決定することができ、FR1、FR2、FR3およびFR4領域の配列からなる。同様の方法で、抗MUC1軽鎖フレームワークについては、配列番号3に示す配列から、上記文献を参照して決定することができ、FR1'、FR2'、FR3'およびFR4'領域の配列からなる。

【0080】

50

好ましい実施形態では、本発明はまた、配列番号2(12D10のV_H配列)のフレームワークと実質的に同一のアミノ酸配列を有する第1のドメイン、または配列番号3(12D10のV_L配列)のフレームワークと実質的に同一のアミノ酸配列を有する第2のドメイン、のいずれかを含む少なくとも1つの抗原結合部位を含むMUC1結合分子を提供する。

【0081】

すべてのヒトに天然に見られるタンパク質に対し生ずるモノクローナル抗体は、典型的に、非ヒト系、例えばマウスで生産することができる。この直接の結果として、ヒトに投与されたとき、ハイブリドーマにより産生されるような異種個体抗体は、異種個体免疫グロブリンの定常部分により優勢的に仲介される望ましくない免疫応答を顕在化する。これは、長期間にわたり投与できないような抗体の使用を明らかに制限する。そのため、単一鎖、単一ドメイン、キメラ、CDR移植、または特に、ヒトに投与したときに実質的なアレルギー応答を示さないと予測されるヒトの抗体の使用が特に好ましい。

10

【0082】

本発明のより好ましい抗MUC1抗体、その抗原結合性断片、またはMUC1結合分子は、少なくともa)(i)配列中に超可変部位、CDR1、CDR2およびCDR3を含み、この場合、CDR1は、SHDMS(配列番号4)という配列またはその改変体を有し、CDR2は、AINSDGDNTYYPDTMER(配列番号5)という配列またはその改変体を有し、CDR3は、LTLRNWYFDV(配列番号6)という配列またはその改変体を有する、免疫グロブリン重鎖可変ドメイン(V_H)またはその断片および(i i)ヒト重鎖の定常部分またはその断片、そしてb)(i)配列中に超可変部位、CDR1'、CDR2'およびCDR3'を含み、この場合、CDR1'は、KSSQSLLYSTNQQLNYLA(配列番号7)という配列またはその改変体を有し、CDR2'は、WASTRES(配列番号8)という配列またはその改変体を有し、CDR3'は、QQYRYPPPT(配列番号9)という配列またはその改変体を有する、免疫グロブリン軽鎖可変ドメインまたはその断片および(i i)ヒト軽鎖の定常部分またはその断片、ならびにそれらの直接の等価物を含む抗体から選択される。

20

【0083】

他に、本発明の抗MUC1抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子は、a)配列中に超可変領域である、CDR1、CDR2およびCDR3を含み、この場合、当該超可変領域は、配列番号2に示すようなアミノ酸配列を有する、第1のドメイン、b)配列中に超可変部位、CDR1'、CDR2'およびCDR3'を含み、この場合、当該超可変領域は、配列番号3に示すようなアミノ酸配列を有する、第2のドメイン、c)第1のドメインのN終末端および第2のドメインのC終末端に、または第1のドメインのC末端および第2のドメインのN末端に、いずれかに結合するペプチドリンカーおよびそれらの直接の等価物を含む抗原結合部位を含む単一鎖結合分子から選択され得る。

30

【0084】

周知のように、1アミノ酸もしくは複数のアミノ酸の欠失、付加、挿入または置換のようなマイナーチェンジによって、実質的に同一性を有するオリジナルタンパク質に対応するタンパク質を生産することができる。

40

【0085】

本明細書において上記「直接の等価物」は、抗MUC1抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子であって、(i)超可変領域CDR1、CDR2およびCDR3は、全体として、配列番号4、5または6に示す超可変領域に対し、少なくとも80%以上の同一性、好ましくは少なくとも90%以上の同一性、より好ましくは少なくとも95%以上の同一性がある、任意の抗MUC1抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子であって、(i i)超可変領域CDR1'、CDR2'およびCDR3'は、全体として、配列番号7、8または9に示す超可変領域に対し、少なくとも80%以上の同一性、好ましくは少なくとも90%以上の同一性、より好ましくは少なくとも95%以上の同一性がある分子のいずれかを意味する。本明細書では、複数のアミノ酸配列には、当該配列を

50

最適に並べると同様な位置で少なくとも80%以上同一アミノ酸残基を有する場合、お互いに対し少なくとも80%以上相同性があり、この場合、アミノ酸配列中のギャップまたは挿入が非同一次基として数えられる。

【0086】

ヒト重鎖の定常部分は、 1 、 2 、 3 、 4 、 μ 、 1 、 2 、またはタイプ、好ましくはタイプ、より好ましくは 1 タイプであり得、一方、ヒト軽鎖の定常部分は、またはタイプ(1 、 2 および 3 サブタイプを含む)であり得るが、好ましくはタイプである。すべてこれら定常部分のアミノ酸配列は、K a b a tらより提供される。

【0087】

通常的手法において、従って、(i)本発明の単ドメインMUC1結合分子、本発明の単鎖MUC1結合分子、本発明の抗MUC1抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子の重鎖もしくは軽鎖またはその断片をコードするDNA分子(ii)組換え手段による本発明の抗MUC1抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子の産生のための本発明のDNA分子の使用が提供される。

【0088】

(抗体の作製)

本発明の抗体は、当該分野において周知の任意の方法を用いて生産することができる。そのような方法の例示は、実施例に記載されるがそれに限定されない。例えば、抗原を用いて動物を免疫することによって、抗体が産生される。

【0089】

ここで、抗原の調製は、組換えDNA法または化学合成により調製したMUC1の一部のアミノ酸配列の一部のペプチドおよびその糖鎖結合ペプチドなどが挙げられる。そのような方法は、実施例において例示されている。得られたヒトMUC1は、アジュバントと混合し抗原として用いる。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイントの不完全アジュバント等が挙げられ、これらの何れのものも混合してもよい。

【0090】

また、モノクローナル抗体は、それらの哺乳動物から脾臓またはリンパ節を採取し、それらから得られた抗体産生細胞を骨髓腫(ミエローマ)細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得ることができる。細胞融合の方法は既知の方法で行うことができ、例えば、K o e h l e r & M i l s t e i nの方法(Nature, 256, 495-497(1975))に従って作製することができる。目的タンパク質を認識する特異抗体を作製するために、上記に記載した方法に従って目的動物(たとえば、マウス)を免疫する。十分に血中抗体力価が上昇していることを確認し、採血または脾臓細胞を分離する。モノクローナル抗体、特に、C末端やリングを認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、このようにして分離した脾臓細胞とミエローマ細胞を融合して作製し得る。脾臓細胞は前記で免疫した動物、好ましくはマウス由来である。ミエローマ細胞は、哺乳類由来であり、好ましくはマウスミエローマ細胞である。細胞の融合にはポリエチレングリコールなどを用い得る。融合により得られたハイブリドーマをスクリーニングおよびクローニングすることにより、望ましいハイブリドーマを選択し得る。モノクローナル抗体を作製するには、得られたハイブリドーマをインビトロまたはインビボで培養する。好ましくは、インビボで培養する。例えば、マウスモノクローナルを含む腹水を産生させるために、マウスの腹腔内に前記ハイブリドーマを投与する。モノクローナル抗体は、産生された腹水から、当業者に公知の方法により容易に精製され得る。最終免疫後3~10日目に免疫動物から脾臓細胞を採取することが好ましいがこれに限定されない。

【0091】

得られた免疫細胞からハイブリドーマを得るには、例えば、「分子細胞生物学基礎実験法」(南江堂 堀江武一ら, 1994)等に記載されている方法により、継体培養可能な細胞とすることを目的として、例えば、センダイウイルス、ポリエチレングリコール存在

10

20

30

40

50

下、形質細胞腫細胞と抗体を産生する免疫細胞とを融合させて、ハイブリドーマを得ることができる。ここで用いられる形質細胞腫細胞は、同じ恒温動物でも同種の恒温動物由来の形質細胞腫細胞を用いることが望ましく、例えばマウスを免疫動物として得られた脾臓細胞と融合させる場合、マウスミエロマ細胞を用いることが好ましい。形質細胞腫細胞は公知のものを利用できる。

【0092】

ハイブリドーマは、HAT培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン添加培地）により選択し、コロニーが確認された段階で、培養上清に分泌される抗体と抗原との結合を調べる（スクリーニングする）ことにより目的の抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。

10

【0093】

スクリーニングする方法としては、例えば、スポット法、凝集反応法、ウエスタンブロット法、ELISA法などの一般に抗体の検出に用いられている種々の方法が挙げられるが、好ましくは、例えば実施例に例示されるように、ハイブリドーマの培養上清について、MUC1糖ペプチドとの反応性を指標とするELISA法に従い実施される。このスクリーニングによって、がん細胞に特異的な糖鎖を有するMUC1と特異的に反応する目的抗体産生株をスクリーニングすることができる。

【0094】

スクリーニングの結果得た目的抗体産生株のクローニングは、通常の限界希釈法、軟寒天法などにより実施できる。クローニングされたハイブリドーマは、必要に応じて、血清培地または無血清培地で大量培養することができる。この培養によれば、比較的高純度の所望抗体を培養上清として得ることができる。また、ハイブリドーマと適合性のある哺乳動物、例えばマウスなどの腹腔に、ハイブリドーマを接種して、所望抗体をマウス腹水として大量に回収することもできる。本発明の抗体産生ハイブリドーマの培養上清およびマウスなどの腹水は、そのまま粗製抗体液として用いることができる。またこれらは常法に従って、硫酸アンモニウム分画、塩析、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー法などにより精製して、精製抗体とすることができる。

20

【0095】

ポリクローナル抗体は、例えば免疫原で免疫した哺乳動物から採血することにより得られる。該方法において、免疫原で免疫される哺乳動物としては、一般には、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、マウス、ラットなどが用いられる。

30

【0096】

免疫方法は一般的方法により、例えば免疫原を哺乳動物に静脈内、皮内、皮下、腹腔内注射などにより投与することにより行い得る。より具体的には、例えば免疫原を生理食塩水含有リン酸緩衝液（PBS）、生理食塩水などで適当濃度に希釈し、所望により通常のアジュバントと併用して、供試動物に2～3週間間隔で数回投与する。マウスを用いる場合は、一回の投与量を一匹あたり50～100 μ g程度とする。ここで前記アジュバントとは抗原と共に投与したとき、非特異的に抗原に対する免疫反応を増強する物質をいう。通常用いられるアジュバントとしては、百日咳ワクチン、フロインドアジュバントなどを例示できる。最終免疫後3～10日目に哺乳動物の採血を行うことによって、抗血清を得ることができる。抗血清についてはそのままでも、また精製してポリクローナル抗体としても使用できる。

40

【0097】

ポリクローナル抗体の精製方法としては非特異的精製法と特異的精製法が挙げられる。非特異的精製法とは塩析法やイオン交換クロマトグラフィー法などにより主にイムノグロブリン画分を取得することを目的とする。特異的精製法としては固定化抗原によるアフィニティークロマトグラフィー法などが挙げられる。

【0098】

本明細書において抗体を作製するときに使用される「免疫原」とは、本明細書で使用さ

50

れる場合、生物において免疫応答を生じる、または引き起こす能力を有する物質を表す。本発明の抗体の製造に用いられる免疫原は、活性化ハプテンとキャリアタンパク質を用いて、Antibodies: A Laboratory Manual, (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press) 等に記載されている活性エステル法により作製することができる。またAntibodies: A Laboratory Manual, (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press) 等に記載のその他の方法、例えば、カルボジイミド法、グルタルアルデヒド法、ジアゾ法等によっても作製できる。

【0099】

本明細書において抗体を作製するとき使用される「キャリアタンパク質」には、抗原性を高めることが知られている各種のタンパク質をいずれも使用できる。その例としては、例えばウシ血清アルブミン(BSA)、ウシチログロブリン(BTG)、カギアナカサガイのヘモシアニン(KLH)などの高分子物質のほか合成ポリペプチドなどを例示できる。

10

【0100】

本明細書において抗体を作製するとき使用される「ハプテン」とは、部分的な、または不完全な抗原である。ハプテンは主として低分子量の物質であり、単独では抗体の産生を刺激する能力はないが、化学的方法や架橋剤によりキャリアタンパク質と結合させて人工抗原として免疫するとハプテンに対する抗体を得ることができる。本発明においてはMUC1糖ペプチド単独で抗体を産生することは難しいと考えられることから通常は異種のタンパク質や合成ポリペプチドなどのキャリアタンパク質との複合体を調製して免疫原に用いた。

20

【0101】

(免疫学的測定法)

本免疫測定方法に用いる単一特異的な抗体としては、安定的に供給しうるモノクローナル抗体が望ましいがそれに限定されず、任意の分子を用いることができる。以下、モノクローナル抗体を用いて例示する。抗体(第1のモノクローナル抗体)を固相に固定し、抗原を含む資料と共にインキュベートする工程、さらに標識した第2のモノクローナル抗体を加えて、得られた混合物をインキュベートする工程、および混合物中の生成した標識された抗原抗体複合体を検出する工程を包含するサンドイッチ免疫学的測定法が例示される。また、本発明の免疫学的測定法では、試料と、固相化した第1のモノクローナル抗体および標識した第2のモノクローナル抗体とを同時にインキュベートしてもよい。サンドイッチ免疫学的測定法としては、その検出方法により、サンドイッチ放射免疫測定法(RIA法)、サンドイッチ酵素免疫測定法(EIA法)、サンドイッチ蛍光免疫測定法(FIA法)、サンドイッチ発光免疫測定法(CLIA法)、サンドイッチ発光酵素免疫測定法(CLEIA法)、サンドイッチ法に基づく免疫クロマトグラフ法などの全てのサンドイッチ免疫測定法が応用しうる。定量のためには、RIA法、EIA法が好ましい。

30

【0102】

本明細書において「交差反応性(以下、cross reactivityともいう。)」は、免疫交差反応性のことをいう。ある抗原で免疫することにより得られた抗体が別の抗原(関連抗原)とも結合反応を示すときに、この反応を交差反応という。目的とする抗原とその抗体の反応量を基準とした場合に関連抗原とその抗体との反応量の程度を交差反応性として示すことができる。本明細書中においては代表的には1%、または2%、3%、あるいは0.5%、0.2%、0.1%などの親和性の相対値(%)で示すものであれば交差反応性が低いといえる。値が低いほど交差反応性が低く、目的の抗原に対して特異性を有することを示す。主に目的抗原と関連抗原の構造が非常に類似しているために起こることが多い。

40

【0103】

本発明の(抗MUC1)抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子は、マイクロタイタープレート、ビーズ、チューブ、メンブレン、濾紙、プラスチック性カップなど

50

の担体に固相することができ、特に、ポリエチレンビーズが好適に用いられる。測定する試料は、ヒトの血漿、血清、血液、尿などヒトMUC1を含む試料であり得る。本発明の抗MUC1抗体、その抗原結合性断片または、MUC1結合分子は、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質、または目視判定可能な官位測定法などでは金コロイドや着色ラテックスなどにより標識され得る。標識に用いられる放射性同位元素としては、 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^{131}I などであり、特に、 ^{125}I が好適に用いられる。これらは、クロラミンT法、ペルオキシダーゼ法、Iodogen法、ボルトハンター法などにより、モノクローナル抗体に結合され得る。標識に用い得る酵素としては、例えば、ガラクトシダーゼ(GAL)、アルカリフォスファターゼ(ALP)、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)などを含む。これらは、過ヨウ素酸架橋法(仲根法)、石川らの方法(医学書院; 酵素免疫測定法, 第3版, 75-127, (1987).)などによりモノクローナル抗体に結合され得る。標識に用いる蛍光物質としては、フルオレセイン、フルオレサミン、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネートなどがある。標識に用いる発光物質としては、ルシフェリン、ルミノール誘導体、アクリジニウムエステルなどがある。簡易測定法などでは、金コロイドや着色ラテックスを用いてもよい。

【0104】

本発明の1つの実施態様によれば、サンドイッチRIA法が行われ得る。サンドイッチRIA法は、具体的には、標準溶液または試料に、第1のモノクローナル抗体を固相したビーズを加えて混和し、4 から45、好ましくは25 から37で、1から4時間、好ましくは2時間インキュベートする(第1反応)。洗浄後、例えば ^{125}I で標識した第2のモノクローナル抗体を含む溶液を加え、4 ~ 45、好ましくは25 から37で、1から4時間好ましくは2時間インキュベートし、ビーズ上に抗体/抗体複合体を形成する(第2反応)。洗浄後、ビーズに結合した抗原抗体複合体の放射活性をガンマカウンターなどで検出することよりの量を測定し得る。他の好ましい実施態様によれば、サンドイッチEIA法が行われ得る。サンドイッチEIA法は、具体的には、標準溶液または試料に、第1のモノクローナル抗体を固定したビーズを加えて混和し、4 から45、好ましくは25 から37で、1から4時間、好ましくは2時間インキュベートする(第1反応)。洗浄後、酵素標識、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)で標識した第2のモノクローナル抗体を含む溶液を加え、4 ~ 45、好ましくは25 ~ 37で、1~4時間好ましくは2時間インキュベートし、ビーズ上に抗体-抗体からなる免疫複合体を形成する(第2反応)。ビーズ上の酵素活性を、酵素に特異的な基質、例えば、標識酵素がHRPであればテトラメチルベンジジン(TMB)を介して比色法により測定し、それによりビーズ上の捕獲された量を測定し得る。比色定量は、通常分光光度計などで行われ得る。

【0105】

本発明の1つの実施形態において、抗原結合能の測定は、次のようにして測定することができる。抗原結合測定のためのCell ELISAプレートでは、次のようにして調製する。ヒト乳がん細胞T-47D(ATCC HTB-133)を、細胞培養用96穴プレートの60穴に 1×10^6 個の細胞数で播き込む。これを CO_2 インキュベーターで1日培養し(10%の牛胎児血清(GIBCO)を含むRPMI1640培地)、細胞を接着させる。培養液を捨て、300 μl のPBSで各穴を2回洗浄する。4%のパラホルムアルデヒドを含むPBS(以下、PFA/PBSと称す)を各穴に100 μl 加え、氷上で10分間静置し、細胞を固相化する。PFA/PBSを捨て、300 μl のPBSで各穴を2回洗浄後、250 μl のDBでブロッキングする。MUC1抗体100 μl を各穴に加え、室温にて2時間インキュベートしRBで洗浄後、DBで1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合第2抗体100 μl を加える。室温にて1時間インキュベートしRBで洗浄のち、基質溶液を加え、次に405/655nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(Bio-Rad)で測定する。

【0106】

中和活性は、抗体依存性細胞傷害活性を指標に測定することができる。

【0107】

本発明の1つの実施形態において、抗体依存性細胞傷害活性は以下のようにして測定することができる。すなわち、クロミウム遊離試験による抗体依存性細胞傷害活性を解析することができる。ヒト末梢血単核球 (Human peripheral mononuclear cell、PBMC) は、健康者の末梢血から Ficoll - paque PLUS (GE Healthcare社製) を用いて添付文書に従って分離する。分離したPBMCは、 4×10^6 個/mlになるように10% FCSを含むDMEMを加える。

【0108】

1×10^6 個のヒト乳がん細胞株 (たとえば、T-47D) あるいはヒト乳腺上皮細胞株 (たとえば、184A1) を含むDMEMに、 5^1Cr を含む生理食塩水を加え、 37°C で1時間反応させる。その後、DMEMで適宜洗浄し、規定化された量 (たとえば、 5×10^4 個/ml) になるようにDMEMを加える。この細胞に12D10またはマウス IgG2a (SIGMA-ALDRICH社製) を加え、 37°C で1時間反応させ、適量 (たとえば、 $100 \mu\text{l}$ /ウェル) になるように9ウェルv底プレートに加える。その後、適量、たとえば $100 \mu\text{l}$ のPBMCを加え、 37°C で2時間反応させる。その後、plateを5分間、 $500 \times g$ 、室温で遠心し、 $100 \mu\text{l}$ の上清の線を測定器 (たとえば、ARC-7001 (アロカ社製)) にて測定する。抗体特異的な細胞傷害活性 (cytotoxicity, %) は、次の計算式を用いる。

【0109】

細胞傷害活性 (cytotoxicity, %) = (実験値 - 自然遊離) / (最大遊離 - 自然遊離) $\times 100$

当該分野での技術水準によれば、当業者は、例えばCDRグラフティング法 (例えば、EP 239400) により、ヒト化抗体を作製することができる。

【0110】

本発明は、以下に記載のような抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子の産生のための第1および第2のDNA構成物を含む。

【0111】

第1のDNA構成物は、重鎖またはその断片をコードし、a) フレームワークおよび超可変領域を含み、この場合、超可変領域は、CDR1、CDR2およびCDR3の配列であり、そのアミノ酸配列が配列番号4、5または6で示される、可変ドメインをコードするV_H領域、; このV_H領域は、可変ドメインの最初のアミノ酸をコードするコドンから始まり可変ドメインの最後のアミノ酸をコードするコドンで終わり、そしてb) 重鎖の定常領域の最初のアミノ酸をコードするコドンで始まりその定常領域またはその断片の最後のアミノ酸をコードするコドンで終わる重鎖定常領域またはその断片、その後続くストップコドンを含む。

【0112】

たとえば、この第1のDNA構成物は、上述のV_H領域と、ヒト重鎖の定常領域、より好ましくはヒト 1鎖の定常領域をコードする。この定常領域は、ゲノム由来のDNA断片 (イントロンを含む) またはcDNA断片 (イントロンを伴わない) であり得る。

【0113】

第2のDNA構成物は、軽鎖またはその断片をコードし、a) フレームワークおよび超可変領域を含み、この場合、超可変領域は、CDR1'、CDR2'、CDR3'であり、そのアミノ酸配列が配列番号7、8または9で示される、可変ドメインをコードするV_L領域; このV_L領域は、可変ドメインの最初のアミノ酸をコードするコドンから始まり可変ドメインの最後のアミノ酸をコードするコドンで終わり、そしてb) 軽鎖の定常領域の最初のアミノ酸をコードするコドンで始まりその定常領域またはその断片の最後のアミノ酸をコードするコドンで終わる軽鎖定常領域またはその断片、その後続くストップコドンを含む。好ましくは、定常領域は、ヒト軽鎖の定常領域、より好ましくは、ヒト 鎖

10

20

30

40

50

の定常領域をコードする。

【0114】

本発明はまた、CDR1、CDR2、CDR3、CDR1'、CDR2'またはCDR3'のうちの一つ以上の残基が、例えば、変異、例えば対応するDNA配列の部位特異的変異誘発により、配列番号2に示される残基から誘導された抗MUC1抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を含む。本発明は、その変化した抗MUC1抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子をコードするDNA配列を含む。特に、本発明は、CDR1'またはCDR2'の一つ以上の残基が配列番号7または8に示される残基から変化した抗MUC1抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を含む。

【0115】

上述の第1および第2のDNA構成物では、第1および第2の部分は、イントロンで分離され得、エンハンサーは、通常、第1および第2の部分の間のイントロン中に位置し得る。転写されるが翻訳されないエンハンサーの存在は、効果的な転写を補助し得る。特定の実施態様では、第1および第2のDNA構成物は、有利にはヒト起源の重鎖遺伝子のエンハンサーを含む。

【0116】

本発明の抗体は、キメラ抗体として作製することができ、そのようなキメラ抗体の発現ベクターは、H鎖V領域をコードするDNA断片がクローニングされれば、これらのマウスV領域をコードするDNAを、ヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結して発現させることによってキメラ抗ヒト抗体が得られる。キメラ抗体を作製するための基本的な方法は、クローン化されたcDNAに存在するリーダー配列およびV領域配列を、哺乳類細胞の発現ベクター中にすでに存在するヒト抗体C領域をコードする配列に連結することを含んでなる。あるいは、クローン化されたcDNAに存在するマウスリーダー配列およびV領域配列をヒト抗体C領域をコードする配列に連結した後、哺乳類細胞発現ベクターに連結することを包含する。

【0117】

ヒト抗体C領域の断片は、任意のヒト抗体のH鎖C領域およびヒト抗体のL鎖C領域のものとしてすることができ、例えばヒトH鎖のものについてはC₁、C₂、C₃またはC₄、およびL鎖のものについてはC₁またはC₂を各々挙げることができる。

【0118】

各DNA構成物は、適当な制御配列の制御下、特に適当なプロモーターの制御下に置かれる。任意の種類のプロモーターが使用され得るが、ただし、それは、DNA構成物が発現のため移される宿主生物に適用されるものである。キメラ抗体の製造のためには、エンハンサー/プロモーター系のような発現制御領域のもとでマウスH鎖V領域およびヒトH鎖C領域をコードするDNAを含む発現ベクター、ならびにエンハンサー/プロモーター系のような発現制御領域による制御のもとでマウスL鎖V領域およびヒトL鎖C領域をコードするDNAを含む単一の発現ベクター（例えば、WO94/11523参照）を作製する。次に、この発現ベクターにより哺乳類細胞のような宿主細胞を同時形質転換し、そして形質転換された細胞をインビトロまたはインビボで培養してキメラ抗体を製造する（例えば、WO91/16928参照）。

【0119】

望ましい抗体が細胞培養中またはトランスジェニック動物で産生され得る。適当なトランスジェニック動物は、適当な制御配列の下に置かれる第1および第2のDNA構成物を卵にマイクロインジェクションし、調製された卵を適当な偽妊娠の雌に移し、そして望ましい抗体を発現する子孫を選択することを含む標準的方法に従い得られ得る。

【0120】

抗体鎖が細胞培養中で産生されるとき、当該DNA構成物は、最初に、単一の発現ベクター中にまたは2つ別々であるが適合性の発現ベクター中に挿入されなければならないが、後者の場合のほうが好ましい。

【0121】

10

20

30

40

50

従って、本発明はまた、上記のうちの少なくとも1つのDNA構成物を含む原核細胞系または真核細胞系で複製できる発現ベクターを提供する。

【0122】

次いで、DNA構成物を含む各発現ベクターは、適当な宿主生物に移される。DNA構成物が2つの発現ベクターに別々に挿入されるとき、それらは、別々に、すなわち、細胞あたりの1つの型のベクターで移され得るか、共に移され得る(c o - t r a n s f e r)。適当な宿主生物は、微生物、酵母、または哺乳類細胞系であり、後者が好ましい。より好ましくは、哺乳類細胞系は、リンパ球由来、例えば、骨髄腫、ハイブリドーマまたは通常の不死化B細胞であり、それらは、通常、任意の内因的抗体重鎖または軽鎖を発現しない。

10

【0123】

したがって、本発明の抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子は、(i)上記のような発現ベクターで形質転換される生物を培養すること、および(ii)当該培養物から抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を回収すること、によって作製することができる。

【0124】

DNAの精製および塩基配列の決定のために、以下の方法を用いることができる。PCR産物について、公知手法に従ってアガロースゲル電気泳動を行い、目的とするDNA断片を切り出した後、DNAの回収および精製を行い、ベクターDNAに連結する。DNAの精製は、フェノールおよびクロロホルムで抽出するか(J. Sambrook, et al. 「Molecular Cloning」, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、市販のキット(例えばGENE CLEAN II; BI0101)を用いて行われる。DNA断片を保持するためのベクターDNAには公知のもの(例えばpUC19、Bluescript等)を用いることができる。

20

【0125】

このようなDNAとベクターDNAとを、公知のライゲーションキット(宝酒造製)を用いて連結させ、組換えベクターを得る。次に、得られる組換えベクターを大腸菌JM109コンピテントセル(ニッポンジーン)等に導入した後アンピシリン耐性コロニーを選抜し、公知方法に基づいてベクターDNAを調製する(J. Sambrook, et al. 「Molecular Cloning」, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。目的とするDNAの塩基配列は、上記ベクターDNAを制限酵素で消化した後、公知方法(例えばジデオキシ法)により決定する(J. Sambrook, et al. 「Molecular Cloning」, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。本発明では、自動塩基配列決定装置(たとえば、DNA Sequencer 373A, Applied Biosystems)を用いることができる。

30

【0126】

本発明は、ヒト化抗体としても提供されうる。そのようなヒト化抗体の作製のためにまず、ヒト抗体との相同性検索を行う。

40

【0127】

すなわち、マウスモノクローナル抗体のCDRがヒト抗体に移植されているヒト化抗体を作製するためには、マウスモノクローナル抗体のFRとヒト抗体のFRとの間に高い相同性が存在することが望ましい。従って、マウス抗ヒトTFモノクローナル抗体のH鎖およびL鎖のV領域を、データベースを用いて構造が解明されているすべての既知抗体のV領域と比較する。また、同時にKabataらにより、抗体のFRの長さ、アミノ酸の相同性等によって分類されたヒト抗体のサブグループ(HSG: Human subgroup)(Kabata, E. A.ら、US Dep. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991)との比較を行う。

50

【0128】

ヒトH鎖V領域の場合は、KabatらによるHSG分類により、HSGI~IIIに分類することができる。一方、ヒトL鎖V領域は、KabatらによるHSG分類により、HSGI~IVに分類することができる。

【0129】

従来の技術によりマウス抗体をヒト化する場合には、必要によっては、ヒト化V領域のCDRの構造をより一層もとのマウス抗体の構造に近づけるために、CDRを支持しているマウス抗体のV領域のFRの一部のアミノ酸配列をヒトV領域のFRに移植する場合がある。しかしながら、マウス抗体のV領域FRのどのアミノ酸をヒト抗体V領域のFRに移植すべきかについては、一定の法則がない。従って、CDRの構造を保持するために必須のアミノ酸を特定することは、多くの努力を必要とすることが、他方、CDRが特定されると、一定の結合特異性を有することが推測されることから、本発明においては、12D10が有するCDRの配列を有するものであれば、他の配列が変更されていてもよいことが理解される。

10

【0130】

(医薬)

本発明の抗体は、そのまま単独で投与することも可能であるが、通常各種の医薬製剤として提供するのが好ましい。また、それら医薬製剤は、動物および人に使用される。

【0131】

本発明の抗体の有効用量および投与回数は、投与形態、患者の年齢、体重、治療すべき症状の性質もしくは重篤度等により異なるが、通常、投与量は、1回につき体重1kg当たり0.01~100mg、好ましくは5~50mgであり、投与回数は、1日1回または分割して投与するのが好ましい。

20

【0132】

(アッセイ・検出・診断)

1つの局面において、本発明は、本発明の抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を用いるがん(非上皮性悪性炎症性疾患、腺がん、乳がん、大腸がん、膵臓がん、肺腺がん、非小細胞肺癌、卵巣がん、胃がん、前立腺がん、子宮内膜がん、および結腸直腸がん)の他、嚢胞性線維症、喘息、慢性閉塞性肺疾患などの診断法、本発明の抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を含む診断剤、あるいは抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を含む診断キットを提供する。本発明の診断法、診断剤または診断キットにおいて含まれる抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子は、上述した本発明の抗体その抗原結合性断片またはMUC1結合分子の任意の実施形態でありうるということが理解される。特に、本発明の抗体、抗原結合性断片またはMUC1結合分子は、特定のがんで発現する糖鎖構造に特異的に結合することから、これらのがんの診断に使用されうる。

30

【0133】

別の局面において、本発明は、本発明の抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を用いる、イムノアッセイを提供する。あるいは、本発明は、本発明の抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を用いる、MUC1またはその関連分子の検出方法を提供する。あるいは、本発明の抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を含む検出剤、あるいは抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子を含む検出キットを提供する。本発明のがんの検出法、検出剤または検出キットにおいて含まれる抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子は、上述した本発明の抗体その抗原結合性断片またはMUC1結合分子の任意の実施形態でありうるということが理解される。本発明の抗体、抗原結合性断片またはMUC1結合分子は、特定のがんで発現する糖鎖構造に特異的に結合することから、これらのがんまたは腫瘍細胞の検出に使用されうる。

40

【0134】

本発明の抗体、抗原結合性断片またはMUC1結合分子には、安定性や抗体価を向上させるために、修飾剤が結合された修飾抗体でありうる。この修飾剤としては、例えば、糖

50

鎖、ポリエチレングリコール（PEG）等の高分子などが挙げられる。

【0135】

また、本発明の抗体、その抗原結合性断片またはMUC1結合分子は、標識されうる。この場合、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ（たとえば、ELISA）、蛍光イムノアッセイなどの標識イムノアッセイ等のイムノアッセイで使用されうる。標識イムノアッセイは、バイオアッセイと比較して、一度に数多くの被検試料を分析できるうえに、分析に要する時間と労力が少なく済み、しかも、分析が高精度であるという特徴がある。

【0136】

なお、一般に診断用に用いる抗体は、マウス、ウサギ、ヤギなどのヒト以外の動物を免疫して作成される。しかし、動物の免疫系では、自己の体を構成する分子に結合する抗体を産生するリンパ球は、排除または不活性化される。つまり、動物を免疫して作成した本発明の抗体のうち、ヒトのものと動物のものとで酷似した部分を抗原決定領域とした抗体は含まれない。

【0137】

本発明の抗体、抗原結合性断片またはMUC1結合分子は、がんの診断のためまたは患者における疾患の進行をモニターするためのマーカーとして使用され得る。1つの実施態様において、患者のがんは、患者から得られる生物学的サンプルを、MUC1レベルについて、あらかじめ決定されたカットオフ値と比較して評価することにより診断され得る。本明細書中で使用される適切な「生物学的サンプル」は、血液、血清、尿および/または

【0138】

本発明において、サンプル中のポリペプチドマーカーを検出するための結合パートナーを使用することに関して、当業者に公知の種々のアッセイ形式が存在する。例えば、HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照のこと。ある実施態様において、アッセイは、サンプルの残余物からのポリペプチドに結合し、そしてそれを除去するための固相支持体上に固定された結合パートナーの使用を含む。次いで、結合ポリペプチドは、レポーター基を含む第2の結合パートナーを使用して検出され得る。適切な第2の結合パートナーは、結合パートナー/ポリペプチド複合体に結合する抗体を含む。あるいは、競合アッセイが利用され得、ここでは、ポリペプチドは、レポーター基で標識され、そして結合パートナーとサンプルとのインキュベーション後に固定された結合パートナーに結合し得る。サンプルの成分が標識ポリペプチドの結合パートナーへの結合を阻害する程度は、サンプルと固定された結合パートナーとの反応性の指標である。

【0139】

本発明において使用されうる固相支持体は、抗原が付着し得る、当業者に公知の任意の物質であり得る。例えば、固相支持体は、マイクロタイタープレートの試験ウェルまたはニトロセルロースもしくは他の適切な膜であり得る。あるいは、支持体は、ビーズまたはディスク（例えば、ガラス、ファイバーガラス、ラテックス、またはポリスチレンもしくはポリ塩化ビニルのようなプラスチック物質）であり得る。支持体はまた、例えば米国特許第5,359,681号に開示されるような磁性粒子または光学繊維センサーであり得る。結合因子は、当業者に公知の種々の技術（これは、特許および科学文献において十分に記載されている）を使用して、固相支持体上に固定され得る。本発明の状況において、用語「固定」は、非共有結合的な会合（例えば、吸着）および共有結合的な付着（これは抗原と支持体上の官能基との間の直接の結合であり得るか、または架橋剤を介する結合であり得る）の両方をいう。吸着によるマイクロタイタープレート中のウェルへのまたは膜への固定を用いてもよい。このような場合、吸着は、結合因子を、適切な緩衝液中で固相支持体と適切な時間量の間で接触させることにより達成され得る。接触時間は温度とともに変化するが、代表的には約1時間～約1日の間である。一般に、プラスチック製のマイクロタイ

10

20

30

40

50

タープレート（例えば、ポリスチレンまたはポリ塩化ビニル）のウェルと、約10 ng ~ 約10 µg、そして好ましくは約100 ng ~ 約1 µgの範囲の量の結合因子との接触は、適切な量の結合因子を固定するのに十分である。

【0140】

本発明において、結合因子の固相支持体への共有結合的な付着は、一般に、支持体および結合因子上の官能基（例えば、ヒドロキシルまたはアミノ基）の両方と反応する二官能性試薬と支持体を最初に反応させることにより達成され得る。例えば、結合因子は、ベンゾキノンを使用するかまたは支持体上のアルデヒド基と結合パートナー上のアミンおよび活性水素との縮合により、適切なポリマーコーティングを有する支持体に共有結合的に付着され得る（例えば、Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook, 1991 A12 - A13を参照のこと）。

10

【0141】

特定の実施態様において、アッセイは2抗体サンドイッチアッセイである。このアッセイは、固相支持体（通常、マイクロタイタープレートのウェル）上に固定された抗体とサンプルとを最初に接触させ、それによりサンプル中のポリペプチドを固定された抗体に結合させることにより行われ得る。次いで、非結合のサンプルを固定されたポリペプチド-抗体複合体から除去し、そしてポリペプチド上の異なる部位に結合し得る第2の抗体（レポーター基を含む）が添加される。次いで、固相支持体に結合して留まる第2の抗体の量が、特定のレポーター基に適切な方法を使用して決定される。

【0142】

より詳細には、一旦抗体が上記のように支持体上に固定されると、支持体上の残存するタンパク質結合部位は、代表的にはブロックされる。当業者に公知の任意の適切なブロッキング試薬は、例えばウシ血清アルブミンまたはTween 20TM（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）である。次いで、固定された抗体はサンプルとともにインキュベートされ、そしてポリペプチドは抗体に結合され得る。サンプルは、インキュベーション前に、例えばリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）のような適切な希釈剤で希釈され得る。一般に、適切な接触時間（すなわち、インキュベーション時間）は、がんを有する個体から得られたサンプル中のポリペプチドの存在を検出するのに十分な時間の期間である。好ましくは、接触時間は、結合ポリペプチドと非結合ポリペプチドとの間の平衡において達成されるレベルの少なくとも約95%である結合のレベルを達成するのに十分である。当業者は、平衡に達するのに必要な時間が、ある時間に渡って生じる結合のレベルをアッセイすることにより容易に決定され得ることを認識する。室温において、約30分のインキュベーション時間は、一般に十分である。

20

30

【0143】

次いで、非結合サンプルは、固相支持体を適切な緩衝液（例えば、0.1% Tween 20TMを含むPBS）で洗浄することにより除去され得る。次いで、レポーター基を含む第2の抗体が固相支持体に添加され得る。例示的なレポーター基は、酵素、（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ）、基質、補因子、インヒビター、色素、放射性核種、発光基、蛍光基およびビチオンを含む。抗体のレポーター基への結合は、当業者に公知の標準的な方法を使用して達成され得る。

40

【0144】

次いで、第2の抗体は、固定された抗体-ポリペプチド複合体とともに、結合ポリペプチドを検出するのに十分な時間量の間、インキュベートされる。適切な時間量は一般に、ある時間に渡って生じる結合のレベルをアッセイすることにより決定され得る。次いで、非結合の第2の抗体は除去され、そして結合した第2の抗体がレポーター基を使用することにより検出される。レポーター基を検出するために用いられる方法は、レポーター基の性質に依存する。放射性基については、シンチレーションカウンティング法またはオートラジオグラフ法が一般に適切である。分光学的な方法は、色素、発光基、および蛍光基を検出するために使用され得る。ビチオンは、異なるレポーター基（通常は、放射性基もしくは蛍光基または酵素）と結合したアビジンを使用して検出され得る。酵素のレポーター

50

基は一般に、基質の添加（一般に、特定の時間の間）、それに続く反応産物の分光学的分析または他の分析により検出され得る。

【0145】

がんの存在または非存在を決定するために、固相支持体に結合して留まるレポーター基から検出されるシグナルは、一般に、あらかじめ決定されたカットオフ値に対応するシグナルと比較される。1つの実施態様において、カットオフ値は、固定された抗体ががんを有さない患者からのサンプルとともにインキュベートされた場合に得られるシグナルの平均値である。一般に、あらかじめ決定されたカットオフ値を上回る3つの標準偏差であるシグナルを生じるサンプルは、がんについて陽性であると考えられる。別の実施態様において、カットオフ値は、Sackettら、*Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, Little Brown and Co., 1985, 106-7頁の方法によるReceiver Operator Curveを使用して決定される。簡潔には、この実施態様において、カットオフ値は、診断試験結果のそれぞれの可能なカットオフ値に対応する真の陽性の割合（すなわち、感受性）および偽陽性の割合（100% - 特異性）の組のプロットから決定され得る。上部左隅に最も近いプロット上のカットオフ値（すなわち、最大領域を含む値）は最も正確なカットオフ値であり、そして本発明の方法により決定されるカットオフ値より高いシグナルを生じるサンプルは陽性であると考えられ得る。あるいは、カットオフ値は、プロットに沿って、偽陽性の割合を最小にするために左にシフトし得るか、または偽陰性の割合を最小にするために右にシフトし得る。一般に、本方法により決定されるカットオフ値より高いシグナルを生じるサンプルは、そのがんについて陽性であるとされる。

【0146】

関連する実施態様において、アッセイは、フロースルーまたはストリップ試験形式において実施され、ここで抗体は、膜上（例えば、ニトロセルロース）に固定化されている。フロースルー試験において、サンプルが膜を通過する際にサンプル内のポリペプチドは固定化抗体に結合する。次いで、第2の抗体を含む液体が膜を通過する際に、第2の標識抗体は、抗体-ポリペプチド複合体に結合する。次いで、結合された第2の抗体の検出は、上記のように実施され得る。ストリップ試験形式において、抗体が結合している膜の一端はサンプルを含む溶液に浸される。第2の抗体を含む領域を通る膜に沿ってそして固定化抗体の領域にまでサンプルが移動する。固定化抗体の領域における第2の抗体の濃度は、がんの存在を示す。代表的には、この部位における第2の抗体の濃度は、パターン（例えば、線）を形成し、これは、視覚的に読まれ得る。このようなパターンの非存在は、陰性の結果を示す。一般に、膜上の固定化抗体の量は、上記の形式において2抗体サンドイッチアッセイにおける陽性シグナルを生成するのに十分なレベルのポリペプチドを生物学的サンプルが含む場合、視覚的に認識し得るパターンを生成するように選択される。好ましくは、膜上の固定化抗体の量は、約25 ng ~ 約1 µgの範囲であり、そしてより好ましくは、約50 ng ~ 約500 ngである。このような試験は代表的には、非常に少量の生物学的サンプルと共に実施され得る。

【0147】

もちろん、本発明の抗体または抗体との使用に適切な多数の他のアッセイプロトコルが存在する。上記は、単なる例示であることが意図される。

【0148】

本発明はまた、本発明の医薬組成物またはアッセイキットを製造するシステム、装置、キットにも関する。そのようなシステム、装置、キットの構成要件は、当該分野において公知のものを利用することができ、当業者は適宜設計することができることが理解される。

【0149】

本発明はまた、本発明の化合物、その製薬上許容される塩、またはそれらの水和物等プロドラッグを使用するシステム、装置、キットにも関する。そのようなシステム、装置、

10

20

30

40

50

キットの構成要件は、当該分野において公知のものを利用することができ、当業者は適宜設計することができることが理解される。

【0150】

本明細書において引用された、科学文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。

【0151】

以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、以下の実施例は、例示の目的のみに提供される。従って、本発明の範囲は、上記実施形態にも下記実施例にも限定されるものではなく、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される。

【実施例】

【0152】

以下、実施例によって本発明を更に詳細に説明するが、この実施例等により本発明の技術的範囲が限定されるものではない。以下に示した実施例において使用した試薬、樹脂等は、特に言及しない限り和光純薬、Sigma-Aldrich等から得ることができる。

【0153】

本実施例で用いられる略語は以下の意味を有する。

DMF：N,N-ジメチルホルムアミド

DCM：ジクロロメタン

HBTU：1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-ベンゾトリアゾリウム-3-オキシドヘキサフルオロホスファート

HOBt：N-ヒドロキシベンゾトリアゾール

DIPEA：ジイソプロピルエチルアミン

Fmoc：(9H-フルオレン-9-イル)メトキシカルボニル

TIS：トリイソプロピルシラン

CMP-NANA：シチジン-5'-モノホスホ-N-アセチルノイラミン酸2ナトリウム

UDP-Gal：ウリジン-5'-ジホスホ-N-ガラクトース2ナトリウム

【0154】

本実施例のマイクロ波照射下における反応は、マイクロ波式有機化学合成装置グリーン・モチーフ・I(東京電子株式会社製)を用いた。

【0155】

(実施例1：MUC1Tn20マー糖ペプチドの合成)

(実施例化合物1の合成)

H-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(Gal13GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-NH₂(1)

糖ペプチド固相合成は、固相担体としてRink Amide-PEGA樹脂(0.05 mmol/g, 500 mg, 25 μmol)を用いた。アミノ酸伸長反応は、マイクロ波照射(40 W、2450 MHz、50)の条件下、Fmocアミノ酸誘導体(75 μmol)、HBTU(75 μmol)とHOBt(75 μmol)、DIPEA(150 μmol)のDMF溶液で5分間反応した。糖鎖置換アミノ酸伸長反応は、Fmoc-Thr(Ac6 core1)-OH：N-Fmoc-O-[O-(2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-D-ガラクトピラノシル)-(13)]-4,6-ジ-O-アセチル-2-アセトアミド-2-デオキシ-D-ガラクトピラノシル}-L-スレオニンを1.5等量使用して同様の条件下20分間反応した。13 mM HOBtの無水酢酸/DIPEA/DMF(4.75:2.25:93 v/v/v)溶液で室温下5分間処理して未反応のアミノ基のアセチル化を実施した。続いて、マイクロ波照射(40 W、2450 MHz、50)の条件下、20%ピペリジン/DMFで3分間処理してFmoc基を脱保護した。糖ペプチドの合成は、こ

10

20

30

40

50

れら3工程(i)各種Fmocアミノ酸での伸長、(ii)アセチル化処理、(iii)脱Fmoc化を順次繰り返した。得られた固相樹脂をトリフルオロ酢酸：水：TIS(93：5：2 v/v/v)で1時間処理した。反応液を濾過し溶媒を留去した後、得られた残渣にエーテルを加えて沈殿させて、粗結晶を得た。粗生成物を逆相高速液体クロマトグラフィーにより精製を行い、糖のアセチル保護体を得た。得られた保護体をメタノールに溶解して、1N水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH 12.0-12.5に調整して室温下1時間処理した。10%酢酸を加えてpH7付近に調整した後、溶媒を留去した。得られた残渣を逆相高速液体クロマトグラフィーにより精製を行い、凍結乾燥粉末として化合物1を得た。

【0156】

10

凍結乾燥粉末(26mg, 収率46%)。MALDI-TOF MS: m/z calcd for $C_{94}H_{152}N_{27}O_{37}$ $[M+H]^+$ 2251.1, found 2250.7. ESI-HRMS: m/z calcd for $C_{94}H_{149}N_{27}O_{37}$ $[M-2H]^{2-}$ 1124.0304, found 1124.0325 $[M-2H]^{2-}$. Amino acid analysis: Ala(4)3.9, Asp(1)1.0, Arg(1)1.0, Gly(2)2.0, His(1)1.1, Pro(5)5.4, Ser(2)1.7, Thr(3)2.8, Val(1)1.0.

【0157】

20

(実施例化合物2の合成)

H-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(Neu5Ac₂Gal₁GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-NH₂(2)

化合物1(22.5mg)、CMP-NANA(32.9mg)と2,3-(O)-シアル酸糖転移酵素(44mU)の50mM HEPES緩衝液(10mM MnCl₂, 0.1% BSA, pH7.0)(5.0ml)溶液の条件下、25℃で24時間静置反応した。反応混合物は、逆相高速液体クロマトグラフィーにより精製して凍結乾燥粉末として化合物2を得た。

【0158】

30

凍結乾燥粉末(20mg, 収率80%)。MALDI-TOF MS: m/z calcd for $C_{94}H_{152}N_{27}O_{37}$ $[M+H]^+$ 2251.1, found 2250.7. ESI-HRMS: m/z calcd for $C_{94}H_{149}N_{27}O_{37}$ $[M-2H]^{2-}$ 1124.0304, found 1124.0325 $[M-2H]^{2-}$. Amino acid analysis: Ala(4)3.9, Asp(1)1.0, Arg(1)1.0, Gly(2)2.0, His(1)1.1, Pro(5)5.4, Ser(2)1.7, Thr(3)2.8, Val(1)1.0.

【0159】

40

(実施例化合物3の合成)

H-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-NH₂(3)

化合物1と同様にして、Fmoc-Thr(Ac₃Tn)-OH: N-Fmoc-O-(3,4,6-トリ-O-アセチル-2-アセトアミド-2-デオキシ-D-ガラクトピラノシル)-L-スレオニンを用い合成した。

【0160】

凍結乾燥粉末(15mg, 収率14%)。MALDI-TOF MS: m/z calcd for $C_{88}H_{141}N_{27}O_{32}$ $[M+H]^+$ 2089.0, found 2089.1. ESI-HRMS: m/z calcd for $C_{88}H_{143}N_{27}O_{32}$ $[M+3H]^{3+}$ 697.0157, found 697.01

50

74. Amino acid analysis: Ala(4)4.0, Asp(1)1.0, Arg(1)1.0, Gly(2)1.9, His(1)1.0, Pro(5)5.2, Ser(2)1.7, Thr(3)2.8, Val(1)1.0.

【0161】

(実施例化合物4の合成)

H-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(Neu5Ac26GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-NH₂(4)

化合物1と同様にして、Fmoc-Thr(Ac6SialylTn)-OH:N - Fmoc-O-{[メチル-(5-アセトアミド-4,7,8,9-テトラ-O-アセチル-3,5-ジデオキシ-D-グリセロ-D-ガラクト-2-ノヌロピラノシル)オナト-(26)]-3,4-ジ-O-アセチル-2-アセトアミド-2-デオキシ-D-ガラクトピラノシル}-L-スレオニンを用いて、合成した。糖部分の脱アセチル化を行った後、水に溶解して1N水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH12.0以下に調整して室温下6時間処理した。10%酢酸を加えてpH7付近に調整した後、精製を行い凍結乾燥粉末として化合物4を得た。

10

【0162】

凍結乾燥粉末(2mg, 収率15%) .MALDI-TOF MS: m/z calcd for C₉₉H₁₅₈N₂₈O₄₀ [M+H]⁺ 2380.1, found 2380.1.ESI-HRMS: m/z calcd for C₉₉H₁₅₈N₂₈O₄₀ [M+3H]³⁺ 794.0475, found 794.0494. Amino acid analysis: Ala(4)3.9, Asp(1)1.0, Arg(1)1.0, Gly(2)1.9, His(1)0.8, Pro(5)5.1, Ser(2)1.7, Thr(3)2.8, Val(1)1.0.

20

【0163】

(実施例化合物5の合成)

H-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(Gal13[GlcNAc16]GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-NH₂(5)

化合物1と同様にして、Fmoc-Thr(Ac7core2-OH:N - Fmoc-O-{(2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-D-ガラクトピラノシル)-(13)-O-[2-アセトアミド-3,4,6-トリ-O-アセチル-2-デオキシ-D-グルコピラノシル-(16)]-2-アセトアミド-2-デオキシ-D-ガラクトピラノシル}-L-スレオニンを用いて化合物5を得た。

30

【0164】

凍結乾燥粉末(51mg, 収率: 52%) .MALDI-TOF MS: m/z calcd for C₁₀₂H₁₆₅N₂₈O₄₂ [M+H]⁺ 2454.2, found 2454.5.ESI-HRMS: m/z calcd for C₁₀₂H₁₆₃N₂₈O₄₂ [M-H]⁻ 2452.1479, found 2452.1475. Amino acid analysis: Ala(4)3.7, Asp(1)1.0, Arg(1)1.0, Gly(2)1.9, His(1)0.9, Pro(5)5.2, Ser(2)1.6, Thr(3)2.6, Val(1)0.9.

40

【0165】

(実施例化合物6の合成)

H-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(Neu5Ac23Gal13[GlcNAc16]GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala

50

- NH₂ (6)

化合物5およびCMP-NANAと2,3-(O)-シアル酸転移酵素(5 mU/ml)の50 mM HEPES buffer (10 mM MnCl₂, 0.1% BSA, pH 7.0)溶液で反応して化合物6を得た。

【0166】

凍結乾燥粉末(6 mg, quant.), MALDI-TOF MS: m/z calcd for C₁₁₃H₁₈₂N₂₉O₅₀: [M+H]⁺ 2745.3, found 2745.8. ESI-HRMS: m/z calcd for C₁₁₃H₁₈₀N₂₉O₅₀ [M-H]⁻ 2743.2434, found 2743.2410.

10

【0167】

(実施例化合物7の合成)

H-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(Neu5Ac₂Gal₁3[Gal₁4GlcNAc₁6]GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-NH₂ (7)

化合物5およびUDP-Gal, CMP-NANA、1,4-ガラクトース転移酵素(100 mU/ml)と2,3-(O)-シアル酸転移酵素(5 mU/ml)の50 mM HEPES buffer (10 mM MnCl₂, 0.1% BSA, pH 7.0)溶液で反応して化合物7を得た。

20

【0168】

凍結乾燥粉末(7 mg, quant.), MALDI-TOF MS: m/z calcd for C₁₁₉H₁₉₂N₂₉O₅₅ [M+H]⁺ 2907.3, found 2906.5. ESI-HRMS: m/z calcd for C₁₁₉H₁₉₀N₂₉O₅₅ [M-H]⁻ 2905.2962, found 2905.2922.

【0169】

(実施例化合物8の合成)

H-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(Neu5Ac₂Gal₁3[Neu5Ac₂Gal₁4GlcNAc₁6]GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-NH₂ (8)

30

化合物5およびUDP-Gal, CMP-NANA、1,4-ガラクトース転移酵素(100 mU/ml)、2,3-(O)-シアル酸転移酵素(5 mU/ml)と2,3-(N)-シアル酸転移酵素(74 mU/ml)の50 mM HEPES buffer (10 mM MnCl₂, 0.1% BSA, pH 7.0)溶液で反応して化合物8を得た。

【0170】

凍結乾燥粉末(7 mg, 収率 46%), MALDI-TOF MS: m/z calcd for C₁₃₀H₂₀₉N₃₀O₆₃ [M+H]⁺ 3198.4, found 3198.0. ESI-HRMS: m/z calcd for C₁₃₀H₂₀₇N₃₀O₆₃ [M-H]⁻ 3196.3916, found 3196.3899.

40

【0171】

(実施例化合物9の合成)

H-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(GlcNAc₁6GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-NH₂ (9)

化合物4と同様の条件下、Fmoc-Thr(Ac5 core6)-OH: N-Fmoc-O-{[3,4,6-トリ-O-アセチ-2-アセトアミド-2-デオキシ-

50

- D - グルコピラノシル - (1 6)] - 3 , 4 - ジ - O - アセチル - 2 - アセトアミド - 2 - デオキシ - - D - ガラクトピラノシル } - L - スレオニンを用いて合成した。

【 0 1 7 2 】

凍結乾燥粉末 (1 7 m g , 収率 3 0 %) . M A L D I - T O F M S : m / z c a l c d f o r C ₉₆ H ₁₅₅ N ₂₈ O ₃₇ [M + H] ⁺ 2 2 9 2 . 1 , f o u n d 2 2 9 0 . 6 . E S I - H R M S : m / z c a l c d f o r C ₉₆ H ₁₅₄ N ₂₈ O ₃₇ [M + 2 H] ²⁺ 1 1 4 6 . 5 5 9 3 , f o u n d 1 1 4 6 . 5 5 6 8 . A m i n o a c i d a n a l y s i s : A l a (4) 4 . 1 , A s p (1) 1 . 0 , A r g (1) 1 . 0 , G l y (2) 2 . 0 , H i s (1) 1 . 0 , P r o (5) 5 . 4 , S e r (2) 1 . 7 , T h r (3) 2 . 8 , V a l (1) 1 . 0 .

10

【 0 1 7 3 】

(実施例化合物 1 0 の合成)

H - H i s - G l y - V a l - T h r - S e r - A l a - P r o - A s p - T h r (G a l 1 3 [N e u 5 A c 2 6] G a l N A c) - A r g - P r o - A l a - P r o - G l y - S e r - T h r - A l a - P r o - P r o - A l a - N H ₂ (1 0)

化合物 1 と同様にして、Fmoc - Thr (Ac 6 2 , 6 - S i a l y l T) - O H : N - - F m o c - O - { [(2 , 3 , 4 , 6 - テトラ - O - アセチル - - D - ガラクトピラノシル) - (1 3)] - O - [メチル - (5 - アセトアミド - 4 , 7 , 8 , 9 - テトラ - O - アセチル - 3 , 5 - ジデオキシ - - D - グリセロ - D - ガラクト - 2 - ノヌロピラノシル) オナト - (2 6)] - 2 - アセトアミド - 2 - デオキシ - - D - ガラクトピラノシル } - L - スレオニンを用いて化合物 8 を得た。

20

【 0 1 7 4 】

凍結乾燥粉末 (6 m g , 収率 3 9 %) . M A L D I - T O F M S : m / z c a l c d f o r C ₁₀₅ H ₁₆₉ N ₂₈ O ₄₅ [M + H] ⁺ 2 5 4 2 . 2 , f o u n d 2 4 5 2 . 6 . E S I - H R M S : m / z c a l c d f o r C ₁₀₅ H ₁₇₀ N ₂₈ O ₄₅ [M + 2 H] ²⁺ 1 2 7 1 . 5 9 3 7 , f o u n d 1 2 7 1 . 5 9 4 5 . A m i n o a c i d a n a l y s i s : A l a (4) 3 . 8 , A s p (1) 1 . 0 , A r g (1) 1 . 0 , G l y (2) 1 . 9 , H i s (1) 0 . 9 , P r o (5) 5 . 2 , S e r (2) 1 . 6 , T h r (3) 2 . 7 , V a l (1) 0 . 9 .

30

【 0 1 7 5 】

(実施例化合物 1 1 の合成)

H - H i s - G l y - V a l - T h r - S e r - A l a - P r o - A s p - T h r (N e u 5 A c 2 3 G a l 1 3 [N e u 5 A c 2 6] G a l N A c) - A r g - P r o - A l a - P r o - G l y - S e r - T h r - A l a - P r o - P r o - A l a - N H ₂ (1 1)

化合物 2 と同様の条件により合成した。

【 0 1 7 6 】

凍結乾燥粉末 (2 m g , q u a n t .) . M A L D I - T O F M S : m / z c a l c d f o r C ₁₁₆ H ₁₈₆ N ₂₉ O ₅₃ [M + H] ⁺ 2 8 3 3 . 3 , f o u n d 2 8 3 3 . 2 . E S I - H R M S : m / z c a l c d f o r C ₁₁₆ H ₁₁₈₇ N ₂₉ O ₅₃ [M + 2 H] ²⁺ 1 4 1 7 . 1 4 1 5 , f o u n d 1 4 1 7 . 1 4 4 6 . A m i n o a c i d a n a l y s i s : A l a (4) 3 . 8 , A s p (1) 1 . 0 , A r g (1) 1 . 0 , G l y (2) 1 . 9 , H i s (1) 0 . 8 , P r o (5) 5 . 2 , S e r (2) 1 . 6 , T h r (3) 2 . 7 , V a l (1) 0 . 9 .

40

(実施例化合物 1 2 の合成)

H - H i s - G l y - V a l - T h r (N e u 5 A c 2 3 G a l 1 3 G a l N A c) - S e r - A l a - P r o - A s p - T h r - A r g - P r o - A l a - P r o

50

- Gly - Ser - Thr - Ala - Pro - Pro - Ala - NH₂ (12)

化合物2と同様の条件により合成した。

【0177】

凍結乾燥粉末(2mg, 収率 14%) . MALDI - TOF MS: m/z calcd for C₁₀₅H₁₆₉N₂₈O₄₅ [M+H]⁺ 2542.2, found 2451.6 . ESI - HRMS: m/z calcd for C₁₀₅H₁₆₈N₂₈O₄₅ [M+3H]³⁺ 848.0651, found 848.0668 . Amino acid analysis: Ala(4)4.0, Asp(1)1.0, Arg(1)1.0, Gly(2)2.0, His(1)0.8, Pro(5)5.3, Ser(2)1.7, Thr(3)2.8, Val(1)1.0.

10

【0178】

(実施例化合物13の合成)

H - His - Gly - Val - Thr - Ser - Ala - Pro - Asp - Thr - Arg - Pro - Ala - Pro - Gly - Ser - Thr - Ala - Pro - Pro - Ala - His - Gly - Val - Thr - Ser - Ala - Pro - Asp - Thr - Arg - Pro - Ala - Pro - Gly - Ser - Thr - Ala - Pro - Pro - Ala - NH₂ (13)

化合物1と同様の条件により合成した。

【0179】

凍結乾燥粉末(11mg, 収率 20%) . MALDI - TOF MS: m/z calcd for C₁₆₀H₂₅₃N₅₁O₅₄ [M+H]⁺ 3753.9, found 3751.1 . ESI - HRMS: m/z calcd for C₁₆₀H₂₅₃N₅₁O₅₄ [M+4H]⁴⁺ 939.2233, found 939.2245 . Amino acid analysis: Ala(4)4.1, Asp(1)1.0, Arg(1)1.0, Gly(2)2.0, His(1)0.9, Pro(5)5.3, Ser(2)1.7, Thr(3)2.8, Val(1)0.9.

20

【0180】

(実施例化合物14の合成)

Biotin - PEG - linker - His - Gly - Val - Thr - Ser - Ala - Pro - Asp - Thr (Neu5Ac 2 6GalNAc) - Arg - Pro - Ala - Pro - Gly - Ser - Thr - Ala - Pro - Pro - Ala - NH₂ (14)

ビオチン化糖ペプチド固相合成は、前述と同様の合成に従った。糖鎖置換アミノ酸伸長反応は、N - Fmoc - O - {O - 4', 7', 8', 9' - テトラ - O - アセチル - 5' - N - アセトアミド - ノイラミン酸メチル - (2' 6) - 3, 4 - ジ - O - アセチル - 2 - アセトアミド - 2 - デオキシ - D - ガラクトピラノシル} - L - スレオニンを1.5等量使用して、最終段階で5等量のPEG試薬、ビオチンを縮合させて合成した。

30

40

【0181】

凍結乾燥粉末(2mg, 収率 7.4%), MALDI - TOF MS: m/z calcd for C₁₁₉H₁₉₁N₃₂O₄₆S [M+H]⁺ 2836.3, found 2836.6.

【0182】

(実施例化合物15の合成)

Biotin - PEG - linker - [His - Gly - Val - Thr - Ser - Ala - Pro - Asp - Thr (Neu5Ac 2 6GalNAc) - Arg - Pro - Ala - Pro - Gly - Ser - Thr - Ala - Pro - Pro - Ala]₂ - NH₂ (15) [40mer 糖ペプチド]

50

化合物12と同様にして、合成した。

【0183】

凍結乾燥粉末(2.0mg, 収率 7.7%), MALDI-TOF MS: m/z calcd for C₂₁₈H₃₄₆N₅₉O₈₆S [M+H]⁺ 5198.4, found 5206.5。

【0184】

(実施例化合物16の合成)

Biotin-PEG-linker-[His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(Neu5Ac 2 6GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala]₃-NH₂ (16) [60mer 糖ペプチド]

10

化合物12と同様にして、合成した。

【0185】

凍結乾燥粉末(1.8mg, 収率 4.7%), MALDI-TOF MS: m/z calcd for C₃₁₇H₅₀₁N₈₆O₁₂₆S [M+H]⁺ 7560.5, found 7576.3。

(実施例化合物17の合成)

Biotin-PEG-linker-[His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(Neu5Ac 2 6GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala]₄-NH₂ (17) [80mer 糖ペプチド]

20

化合物12と同様にして、合成した。

【0186】

凍結乾燥粉末(1.1mg, 収率 2.3%), MALDI-TOF MS: m/z calcd for C₄₁₆H₆₅₆N₁₁₃O₁₆₆S [M+H]⁺ 9922.6, found 9930.8。

【0187】

(実施例化合物18の合成)

Biotin-PEG-linker-[His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(Neu5Ac 2 6GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala]₅-NH₂ (18) [100mer 糖ペプチド]

30

化合物12と同様にして、合成した。

【0188】

凍結乾燥粉末(1.7mg, 収率 2.7%), MALDI-TOF MS: m/z calcd for C₅₁₅H₈₁₁N₁₄₀O₂₀₆S [M+H]⁺ 12284.7, found 12201.9。

【0189】

(実施例化合物19の合成)

Fmoc-Thr(O-Me Ac6 Sialyl Tn)-OH: N-Fmoc-O-{O-4', 7', 8', 9'-テトラ-O-アセチル-5'-N-アセトアミド-ノイラミン酸メチル-(2' 6)-3, 4-ジ-O-アセチル-2-アセトアミド-2-デオキシ-D-ガラクトピラノシル}-L-スレオニンを1.5等量使用して同様の条件下20分間反応した。13mM HOBtの無水酢酸/DIEA/DMF(4.75:2.25:93 v/v/v)溶液で室温下5分間処理して未反応のアミノ基のアセチル化を実施した。続いて、マイクロ波照射(40 W、2450MHz、50)の条件下、20%ピペリジン/DMFで3分間処理してFmoc基を脱保護した。糖ペプチドの合成は、これら3工程(i)各種Fmocアミノ酸での伸長、(ii)アセチル化処理、(iii)脱Fmoc化を順次繰り返した。得られた固相樹脂をトリフルオロ酢酸:水:TIS(93:5:2 v/v/v)で1時間処理した。反応液を濾過し溶媒

40

50

を留去した後、得られた残渣にエーテルを加えて沈殿させて、粗結晶を得た。粗生成物を逆相高速液体クロマトグラフィーにより精製を行い、糖のアセチル保護体を得た。得られた保護体をメタノールに溶解して、1 N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 12.0 - 12.5 に調整して室温下1時間処理した。10%酢酸を加えて pH 7 付近に調整した後、溶媒を留去した。次に、得られたメチルエステル体を水に溶解して、0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 10.5 - 11.0 に調整して室温下1時間処理した。得られた残渣を逆相高速液体クロマトグラフィーにより精製を行い、凍結乾燥粉末として化合物 1 を得た。

【0190】

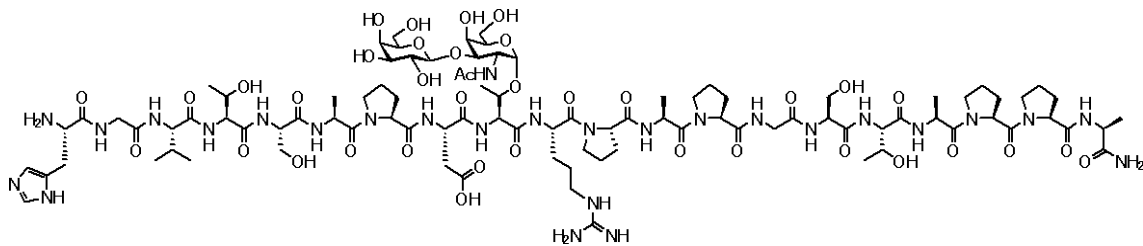
凍結乾燥粉末 (17 mg, 収率 22%) . MALDI - TOF MS : m/z calculated for $C_{102}H_{164}N_{29}O_{41}S$ $[M+H]^+$ 2483.1, found 2482.2.1.

以下に、実施例化合物の化学構造式を示す。

化合物 1

【0191】

【化1】

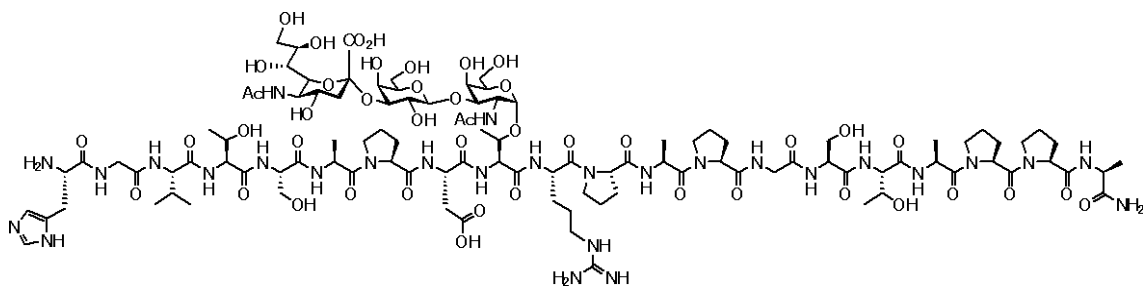


【0192】

化合物 2

【0193】

【化2】

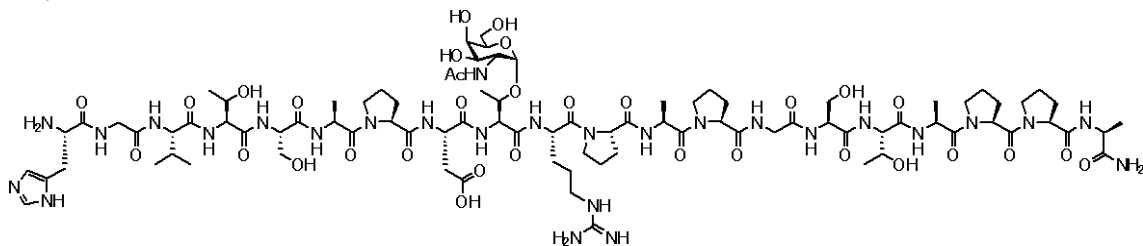


【0194】

化合物 3

【0195】

【化3】



【0196】

10

20

30

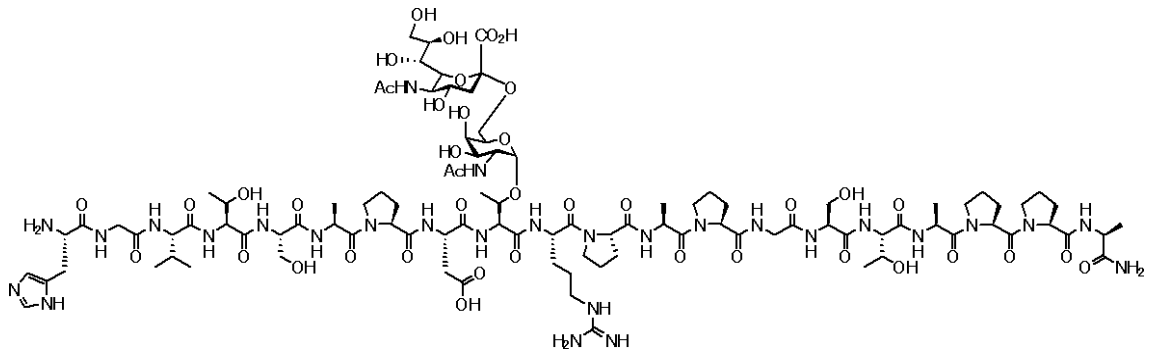
40

50

化合物 4

【 0 1 9 7 】

【 化 4 】



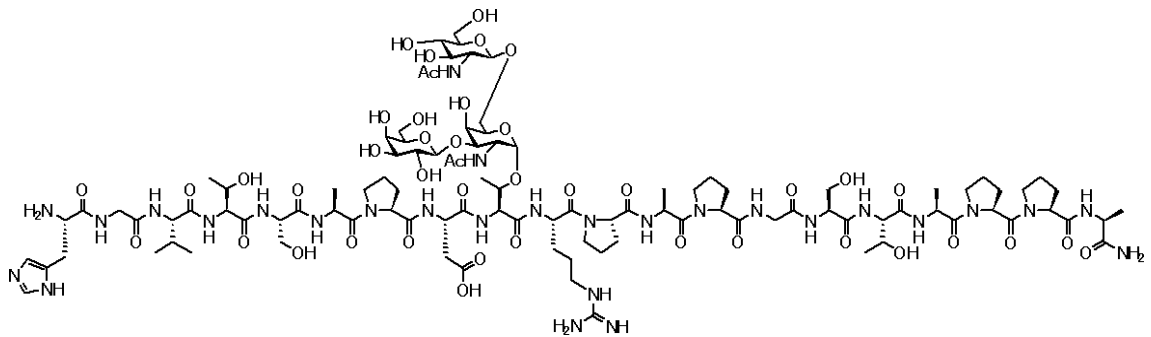
10

【 0 1 9 8 】

化合物 5

【 0 1 9 9 】

【 化 5 】



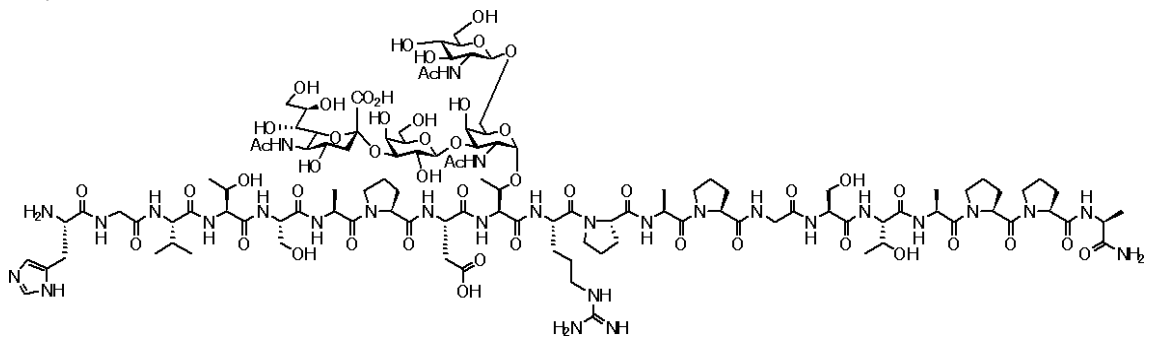
20

【 0 2 0 0 】

化合物 6

【 0 2 0 1 】

【 化 6 】



30

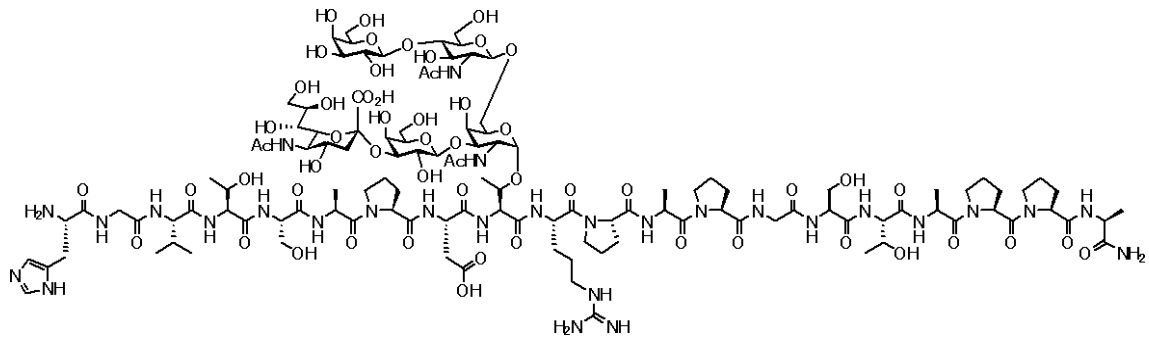
【 0 2 0 2 】

化合物 7

【 0 2 0 3 】

40

【化7】



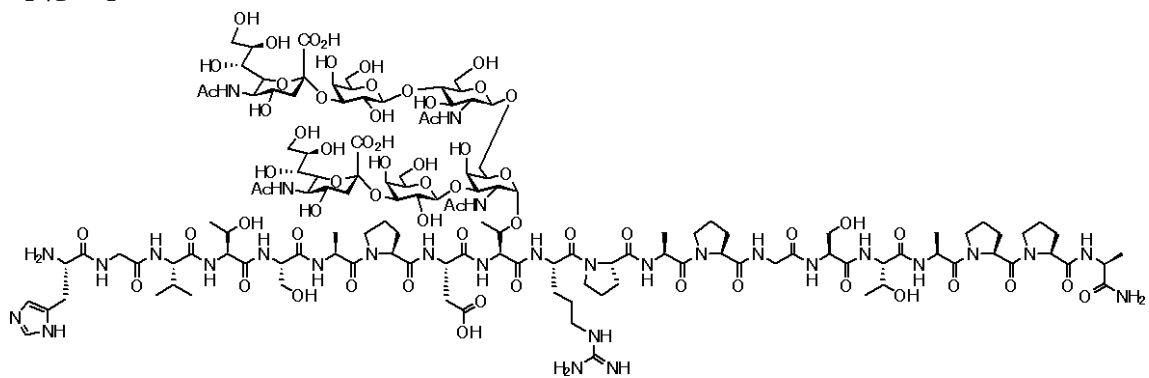
10

【0204】

化合物8

【0205】

【化8】



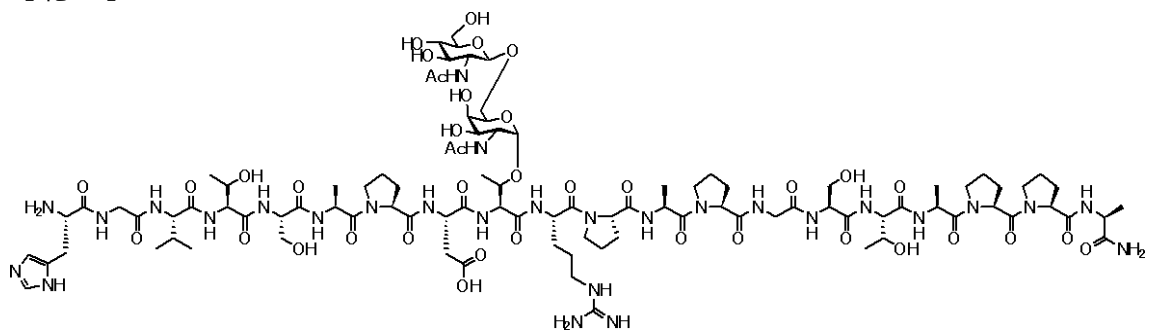
20

【0206】

化合物9

【0207】

【化9】



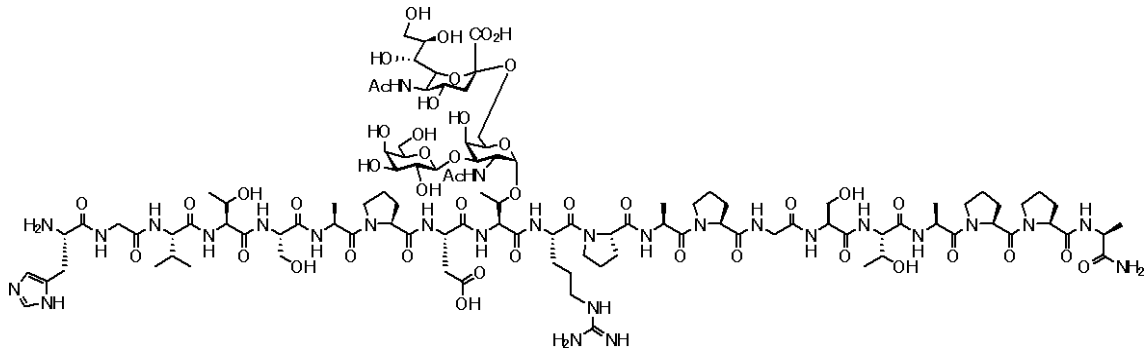
40

【0208】

化合物10

【0209】

【化10】



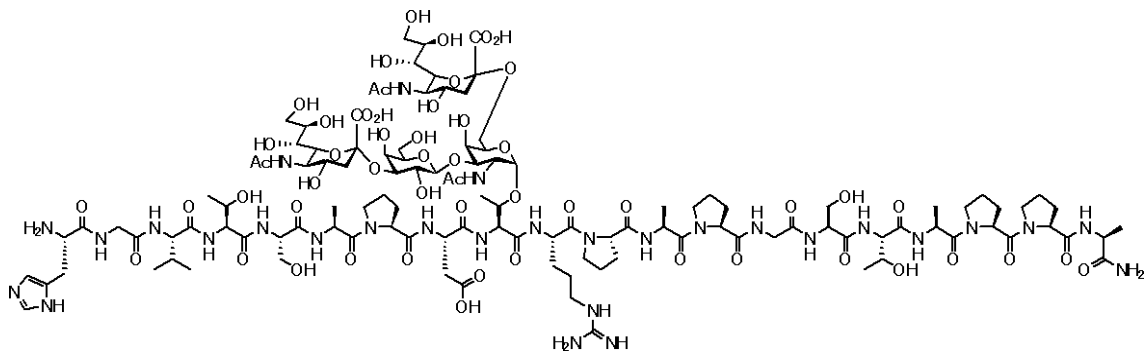
10

【0210】

化合物11

【0211】

【化11】



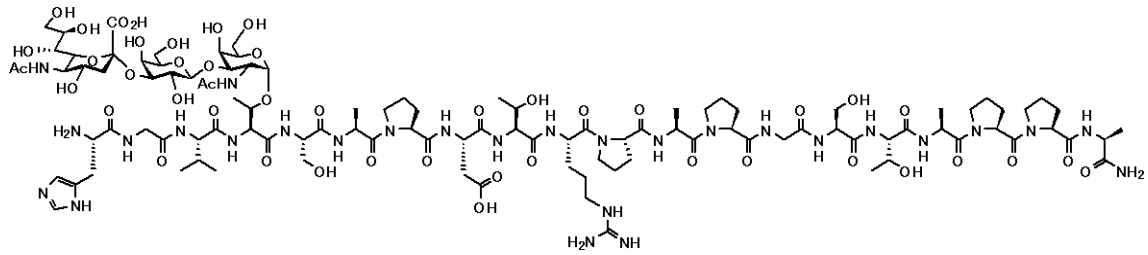
20

【0212】

化合物12

【0213】

【化12】



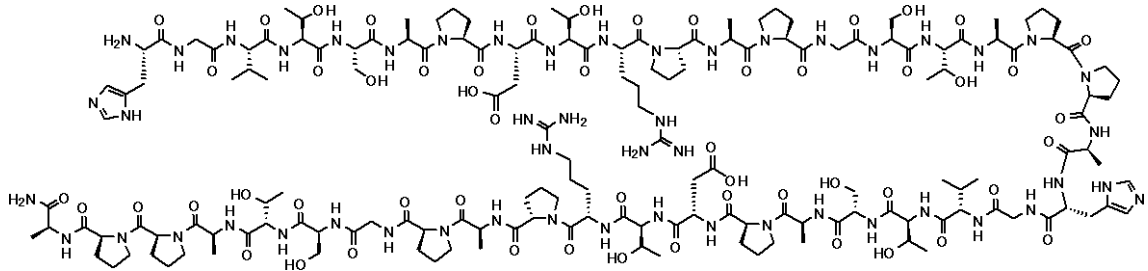
30

【0214】

化合物13

【0215】

【化13】



40

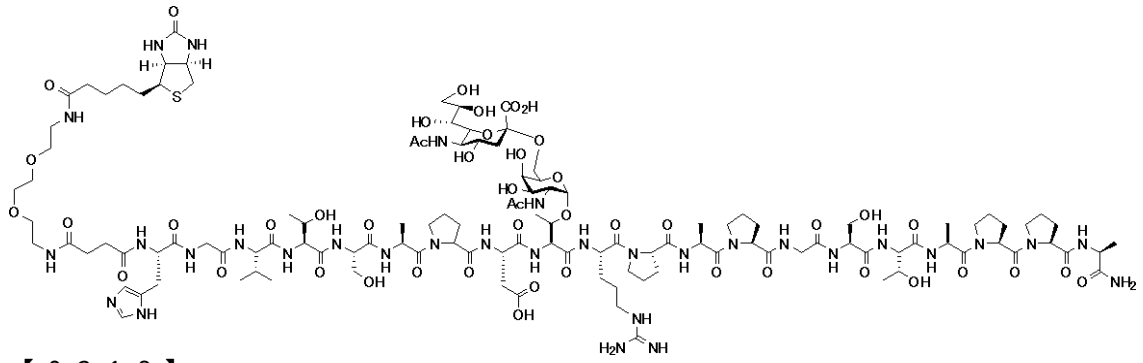
【0216】

化合物14

50

【 0 2 1 7 】

【 化 1 4 】



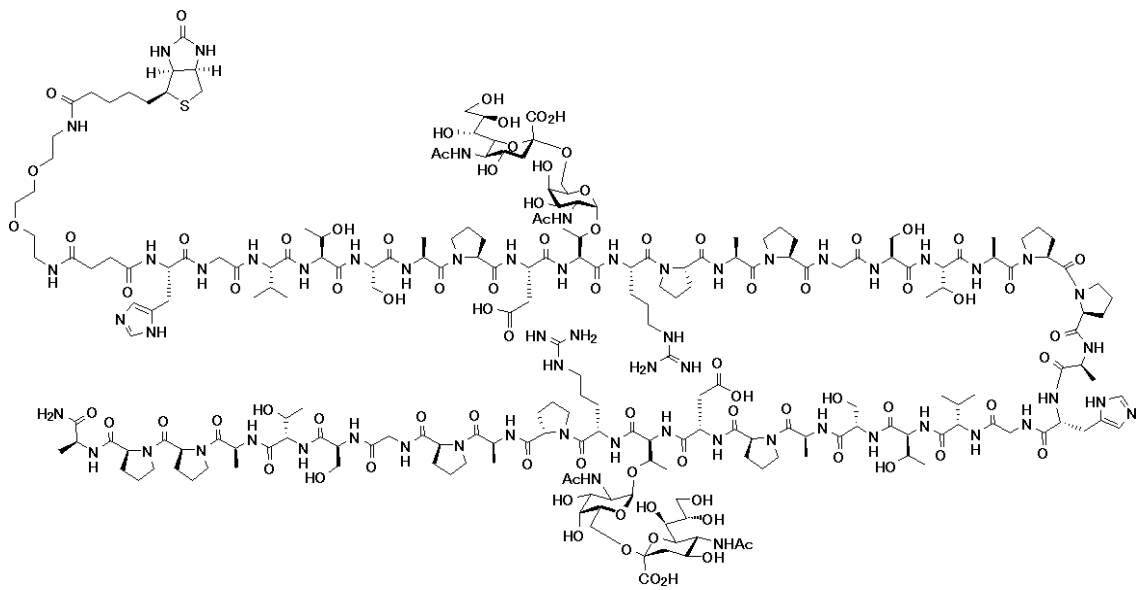
10

【 0 2 1 8 】

化合物 1 5

【 0 2 1 9 】

【 化 1 5 】



20

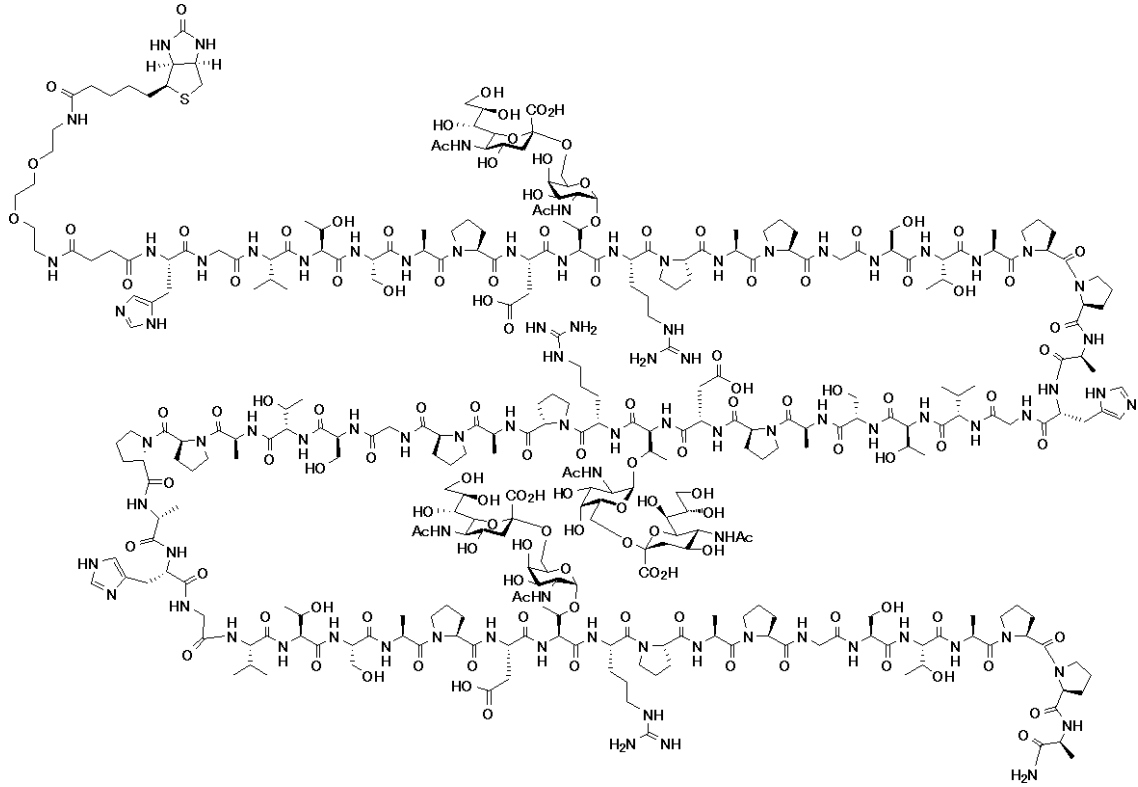
【 0 2 2 0 】

化合物 1 6

【 0 2 2 1 】

30

【化 1 6】



10

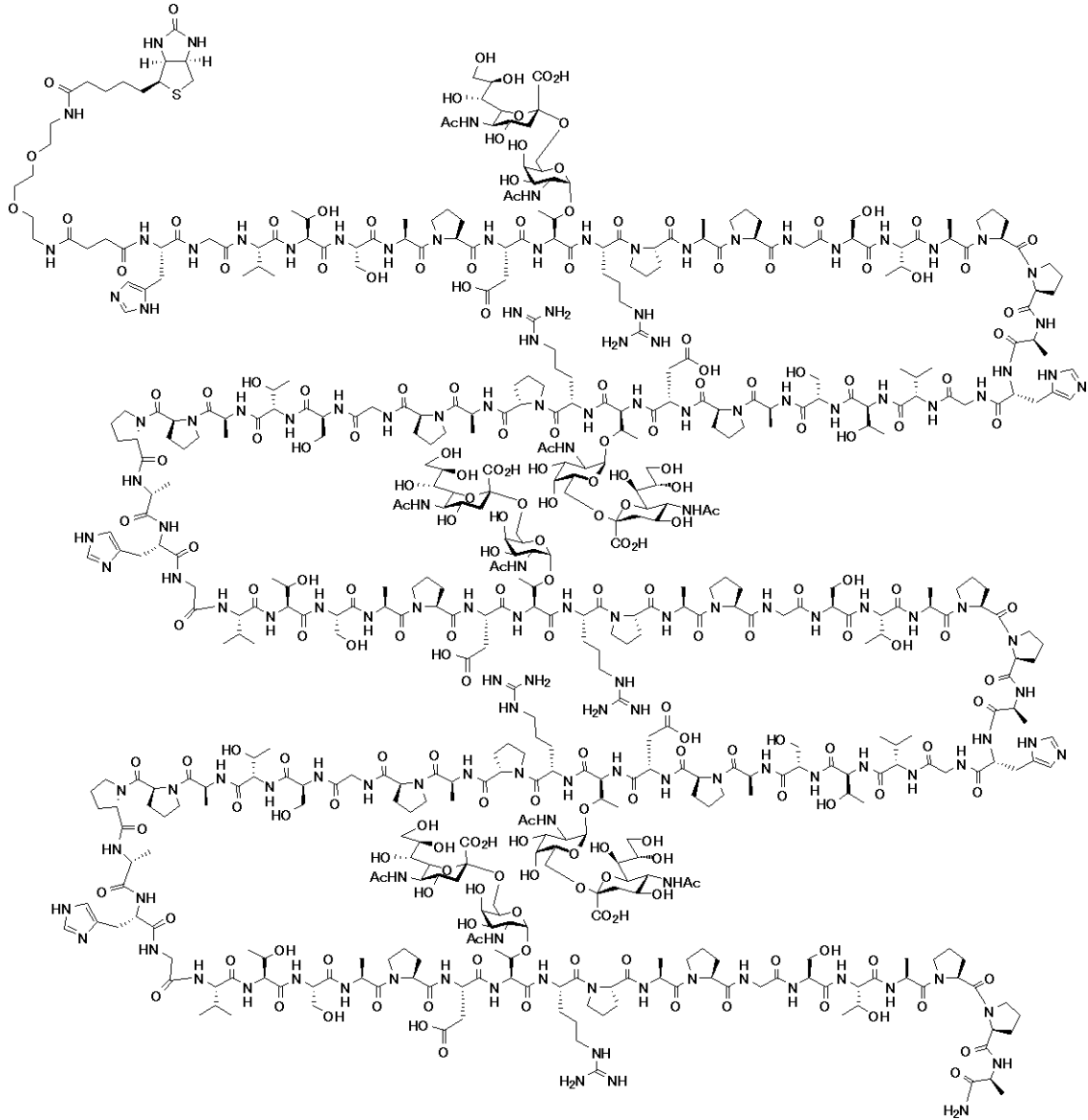
20

【 0 2 2 2 】

化合物 1 7

【 0 2 2 3 】

【化18】



10

20

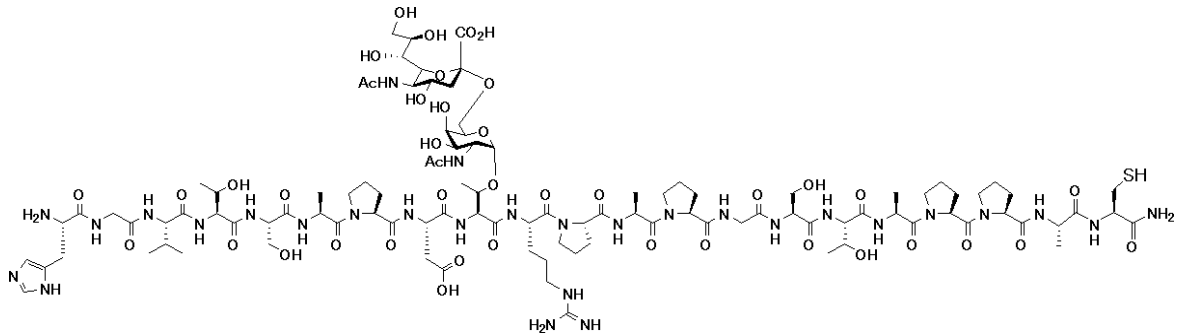
30

【0226】

化合物19

【0227】

【化19】



40

【0228】

化合物番号1から19までの名称を表1のように命名した。

【0229】

【表1】

化合物番号	名称
1	T(DT*R)-20
2	2,3-ST(DT*R)-20
3	Tn(DT*R)-20
4	STn(DT*R)-20
5	T6G(DT*R)-20
6	2,3ST6G(DT*R)-20
7	2,3ST6L(DT*R)-20
8	2,3ST6SL(DT*R)-20
9	C6(DT*R)-20
10	ST2-6(DT*R)-20
11	dST(DT*R)-20
12	2,3ST(VT*S)-20
13	40
14	Biotin-STn(DT*R)-20
15	Biotin-STn(DT*R)-40
16	Biotin-STn(DT*R)-60
17	Biotin-STn(DT*R)-80
18	Biotin-STn(DT*R)-100
19	STn(DT*R)-20-Cys

10

20

30

【0230】

(実施例2: MUC1特異的抗体の生産)

(免疫原の調製)

4.18mgのSTn(DT*R)-20-Cysを0.418mlの5mM EDTAを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH6.0)に溶解し、10mgのImject Maleimide activated mariculture keyhole limpet hemocyanin(Thermo scientific社製)を含む水溶液1mlを加え、室温にて2時間、さらに、4で一晩反応させた。反応液を精製水に対して透析した後に、凍結乾燥し、免疫原とした。

40

【0231】

調製した免疫原100μgをフロイント完全アジュバントと共に4週齢Balb/c雌マウスに腹腔内投与し、初回免疫とした。その後、21日後及び42日後に免疫原100μgをフロイント不完全アジュバントと共に投与し、追加免疫とした。さらに71日後に免疫原100μgを生理食塩水0.1mlに懸濁した溶液を腹腔内投与し、最終免疫とした。

50

【0232】

(ハイブリドーマの作製)

最終免疫の3日後に脾臓を摘出し、脾臓細胞を回収した。脾臓細胞とマウスミエローマ細胞(p3×63-Ag8.U1、東京腫瘍研究所)を50%のポリエチレングリコール4000を用いて融合させ、ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含む培地で選択した。

【0233】

(MUC1抗体の選定)

細胞融合10日後に特異抗体産生細胞のスクリーニングを行った。スクリーニングに用いたELISAは以下の通りである。384穴マイクロタイタープレート(ヌンク社製)の各ウェルに0.35µgの抗マウスIgG抗体(シバヤギ社製)を含むトリス緩衝液(50mM Tris-HCl、pH7.5)を35µl加えて416時間固定した。これらのウェルを90µlの洗浄液(0.01% Tween20を含む生理食塩水)で1回洗浄した後、ブロックエース(大日本住友製薬社製)を200µl加えて室温で2時間放置して、ブロッキングを行った(抗マウスIgG抗体固相化プレート)。各ウェルを90µlの洗浄液で1回洗浄した後、10µlのハイブリドーマ培養上清と10µlの緩衝液A(0.5% ウシ血清アルブミン、0.01% Tween80、0.05% Proclin150、0.15M NaClを含む50mMトリス緩衝液、pH7.4)及び0.01ngのBiotin-STn(DT* R)-20-Cysと2ngのStreptavidin-HRP(PIERCE社製)を含む10µlの緩衝液Aを加え、4で16時間反応させた。次に各ウェルを90µlの洗浄液で3回洗浄した後に、25µlのTMB+ - Substrate - Chromogen(DAKO社製)を添加して室温で30分間発色させた後に、25µlの0.05Mの硫酸を添加し反応を停止し、450nmにおける吸光度を測定した。

【0234】

スクリーニングの結果から、STn(DT* R)-20と強い親和性を示すクローン(12D10)を得た。マウスモノクローナル抗体アイソタイプングELISAキット(BDバイオサイエンス社製)を用いて、抗体のサブクラスを決定した結果、12D10のアイソタイプはIgG1であった。この12D10抗体について、常法を用いて可変領域の配列を決定した。その結果を図4に示す。

【0235】

(実施例3:抗体の特異性の測定)

(糖鎖特異性)

抗マウスIgG抗体固相化プレートに、MUC1抗体を含む15µlの緩衝液Aを加え、室温で3時間反応させた。次に各ウェルを90µlの洗浄液で3回洗浄した後に、Streptavidin-HRPとBiotin-STn(DT* R)-20、およびT(DT* R)-20、2,3-ST(DT* R)-20、Tn(DT* R)-20、STn(DT* R)-20、2,3ST6G(DT* R)-20、2,3ST6L(DT* R)-20、2,3-ST6SL(DT* R)-20、C6(DT* R)-20、ST2-6(DT* R)-20、dST(DT* R)-20、2,3ST(VT* S)-20、40をそれぞれ含む15µlの緩衝液Aを加え、4で16時間反応させた。次に各ウェルを90µlの洗浄液で3回洗浄した後に、15µlのTMB+ - Substrate - Chromogen(DAKO社製)を添加して室温で30分間発色させた後に、15µlの0.05Mの硫酸を添加し反応を停止し、450nmにおける吸光度を測定した。その結果、12D10は、がん細胞で高発現する糖鎖構造(STn(DT* R)-20、ST2-6(DT* R)-20、dST(DT* R)-20)に対して高い親和性を示すが、正常細胞で高発現する糖鎖構造(2,3ST6L(DT* R)-20、2,3-ST6SL(DT* R)-20)との交差反応性は低いことが示された(図1a、表2)。以上のことから、12D10は、がん細胞で高発現する糖鎖型MUC1に対して特異性が高いことが示された。一方、その他のMUC1抗体であるPankomab(Cancer Im

10

20

30

40

50

munol Immunother、2006年、第55巻、1337-1347ページ、米国特許出願公開2006/0292643)、VU-2G7(Tumor Biology Vol. 21、No. 4、197-210ページ、2000年)およびSM3は、12D10よりもがん細胞で高発現する糖鎖構造(STn(DT*R)-20、ST2-6(DT*R)-20、dST(DT*R)-20に対する親和性が低く、正常細胞で高発現する糖鎖構造(2,3ST6L(DT*R)-20、2,3-ST6SL(DT*R)-20)との交差反応性は、12D10よりも高いことが示された(図1b、c、d、表2)。以上のことから、PankoMab、VU-2G7およびSM3よりも12D10の方が、がん細胞で高発現するMUC1に対して特異性が高いことが示された。

【0236】

【表2】

化合物番号	糖ペプチド	STnを100%とした時の交差性 [%]			
		12D10	PankoMab	VU-2G7	SM3
1	T	2.4	754	70	193
2	2,3-ST	2.2	2002	67	145
3	Tn	1.4	498	179	186
4	STn	100	100	100	100
6	2,3ST6G	1.6	29	324	223
7	2,3ST6L	1.6	32	250	29
8	2,3ST6SL	1.6	33	293	51
9	C6	1.2	22	96	218
10	ST2-6	90	89	226	77
11	dST	62	146	177	50
12	2,3ST(VT*S)	<0.10	22	<5.6	<10.3
13	Non-glycosylated	0.13	64	<5.6	32

【0237】

(タンデムリポート依存性)

384穴マイクロタイタープレート(ヌンク社製)の各ウェルに0.35µgのStreptavidin(PIERCE社製)を含むトリス緩衝液(50mM Tris-HCl、pH7.5)を35µl加えて4-16時間固定した。これらのウェルを90µlの洗浄液(0.01% Tween20を含む生理食塩水)で1回洗浄した後、ブロックエース(大日本住友製薬社製)を200µl加えて室温で2時間放置して、ブロッキングを行った(Streptavidin固相化プレート)。各ウェルを90µlの洗浄液で1回洗浄した後、Biotin-STn(DT*R)-20、Biotin-STn(DT*R)-40、Biotin-STn(DT*R)-60、Biotin-STn(DT*R)-80、Biotin-STn(DT*R)-100をそれぞれ含む15µlの緩衝液Aを加え、室温で30分間反応させた。次に各ウェルを90µlの洗浄液で3回洗浄した後に、MUC1抗体を含む15µlの緩衝液Aを加え、4-16時間反応させた。次に各ウェルを90µlの洗浄液で3回洗浄した後に、15µlのTMB+ - Substrate-Chromogen(DAKO社製)を添加して室温で30分間発色させた後に、15µlの0.05Mの硫酸を添加し反応を停止し、450nmにおける吸光度を測定した。その結果、12D10は、Biotin-STn(DT*R)-40、Biot

10

20

30

40

50

in-STn(DT* R) - 60、Biotin-STn(DT* R) - 80、Biotin-STn(DT* R) - 100との反応性はほぼ同じであり、タンデムリピートの長さ依存性が低い抗体であることが示された(図2)。

【0238】

(抗体の親和性)

センサーチップSA(GE Healthcare社製)にBiotin-STn(DT* R) - 20を固相化し、BiacoreT100を用いて12D10の解離定数を解析した結果、12D10の解離定数 K_D は、 9.1×10^{-9} (M)であった(表3)。

【0239】

【表3】

Clone	ka1 (1/Ms)	Kd1 (1/s)	KD (M)
12D10	2.2×10^4	2.0×10^{-4}	9.1×10^{-9}

【0240】

(FACSによる抗体のがん細胞への結合評価)

がん細胞表面に発現するMUC1タンパク質と12D10抗体が結合するかどうかをFACS(fluorescence activated cell sorting)にて調べた。10%FBSを含むDMEM(Invitrogen社製)で培養したヒト乳がん培養細胞株T-47D(ATCC Number HTB-133)、ヒト肺がん培養細胞Calu-3(ATCC Number HTB-55)およびMammary Epithelial Growth Medium(LONZA社製)で培養したヒト乳腺細胞184A1(ATCC Number CRL-8798)を、トリプシン-EDTAにて回収し、5%FBS、0.05%アジ化ナトリウムを含むPBS(FACS buffer)に懸濁する。MUC1抗体を $5 \mu\text{g/ml}$ になるように加えて、室温で2時間反応させた。FACS bufferで2回洗浄した後に、FACS bufferで200倍希釈したFITC標識抗マウスIgG(Invitrogen社製)を加えて、室温で1時間反応させた。FACS bufferで2回洗浄した後に、FACS Aria(ベクトンディッキンソン社製)にて解析した。その結果、コントロールマウスIgG1抗体(SIGMA-ALDRICH社製)と比較して、12D10抗体はT-47Dでは、蛍光シグナルが140倍シフトし、Calu-3では、蛍光シグナルが40倍シフトした。一方、184A1では、蛍光シグナルが2倍シフトした。つまり、20~70倍の差が見られた。この結果から、12D10抗体は、乳がん細胞や肺がん細胞などのがん関連構造を有するMUC1発現細胞とは強く結合するが、乳腺上皮細胞などの正常組織関連構造を有するMUC1発現細胞とは、ほとんど結合しないことが示された(図3)。

【0241】

(実施例4:12D10抗体を用いたMUC1の定量)

MUC1を定量するサンドイッチイムノアッセイは以下の方法で行った。96ウェルマイクロタイタープレート(ヌンク社製)に、 $1 \mu\text{g}$ のStreptavidin(Pierce社製)を含むリン酸緩衝液(50mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl、pH7.4)を100ul加えて4、16時間固定した。これらのウェルを250ulの洗浄液(0.01% Tween20を含む生理食塩水)で1回洗浄した後、ブロッキング(大日本住友製薬社製)を300ul加えて室温で2時間放置して、ブロッキングを行った。各ウェルを250ulの洗浄液で2回洗浄した後、100ngのビオチン化12D10抗体を含む100ulの緩衝液A(0.9% NaCl、0.5% BSA、0.01% Tween80、0.5% ProClinを含む50mMトリス緩衝液、pH7.5)を加えて、室温で1時間反応させた。各ウェルを250ulの洗浄液で2回洗浄した後、100ulの標準溶液(T-47D培養上清)を加え、4、16時間静置した。各

10

20

30

40

50

ウェルを250 μ lの洗浄液で3回洗浄した後、50ngのHRP標識12D10抗体を含む100 μ lの緩衝液Aを加え、1時間反応させる。各ウェルを250 μ lの洗浄液で3回洗浄した後、100 μ lのTMB+ - Substrate - Chromogen (DAKO社製)を添加して室温で30分間発色させた後に、100 μ lの0.05Mの硫酸を添加し反応を停止し、450nmにおける吸光度を測定した。この結果から、12D10抗体を用いたサンドイッチイムノアッセイにて、MUC1を定量することが可能であることが示された。なお、標準溶液(T-47D)の単位(U/ml)は、12D10抗体によるサンドイッチイムノアッセイにて、シアル化糖鎖抗原KL-6キット(エイテストKL-6、三光純薬株式会社)に付属の標準抗原を測定した際の値から決定した。図5に標準曲線を示す。

10

【0242】

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、この実施形態に限定して解釈されるべきものではない。本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。当業者は、本発明の具体的な好ましい実施形態の記載から、本発明の記載および技術常識に基づいて等価な範囲を実施することができることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

【産業上の利用可能性】

【0243】

糖鎖構造レベルで、正常細胞とがん細胞の違いを認識できる抗体が提供された。このような特徴を有する抗体は、医薬、診断薬のほか研究試薬として有用である。

20

【配列表フリーテキスト】

【0244】

配列番号1：Tn20マーのアミノ酸配列

配列番号2：抗体12D10の重鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号3：抗体12D10の軽鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号4：抗体12D10のCDR1のアミノ酸配列

配列番号5：抗体12D10のCDR2のアミノ酸配列

配列番号6：抗体12D10のCDR3のアミノ酸配列

配列番号7：抗体12D10のCDR1'のアミノ酸配列

配列番号8：抗体12D10のCDR2'のアミノ酸配列

配列番号9：抗体12D10のCDR3'のアミノ酸配列

配列番号10：最小配列認識APDTRPAP

配列番号11：MUC1タンデム型反復中の配列SAPDTRP

配列番号12：五量体PDTRP

30

【 4 】

Heavy chain

VH 1: EVQLVESGGGLVQPGESLKLSCESNEYEFPSHDMSVVRKTPFKRLELVAAINSGDNTYY 60
CDR1 CDR2

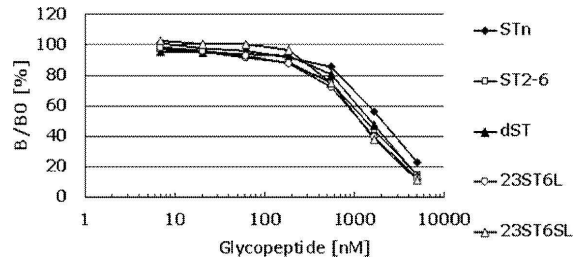
VH 61: PDTMERRFIISRDNSKSKLTLQMSLSNSADTALYCARLTLRNMYFDVWGAGTTVTVSS 119
CDR3

Light chain

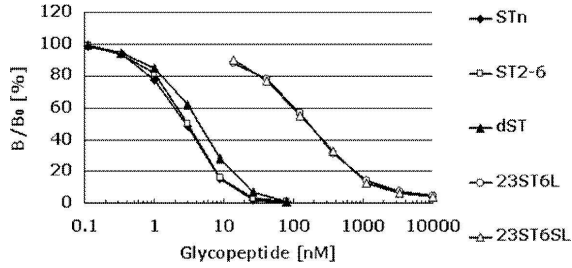
VH 1: DIVMSQSPSSLPVSVGKVTMSCKSSQSLLYSTNQNYLAWYQOKSGQSPKLLVYMASTR 60
CDR1' CDR2'

VH 61: ESGVDRPRTGSGSOTDFLTISSLKAEDLAVYYCQYYRYPTFGAGTKLELNRA 115
CDR3'

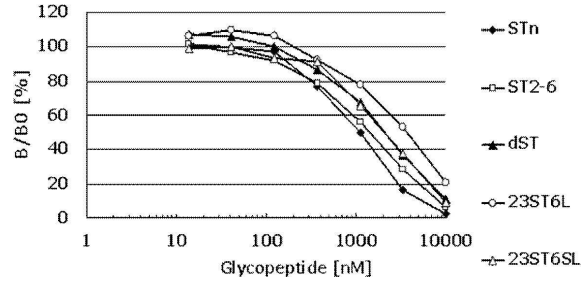
【 1 c 】



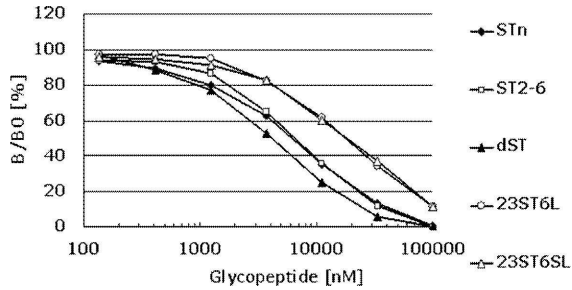
【 1 a 】



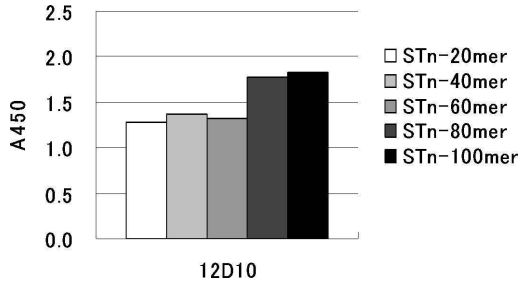
【 1 d 】



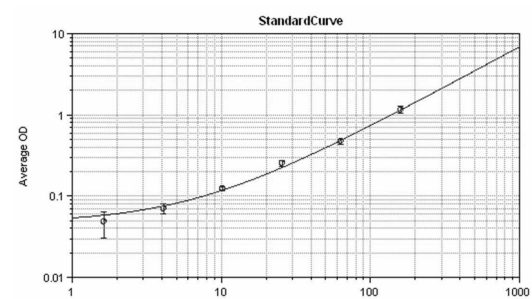
【 1 b 】



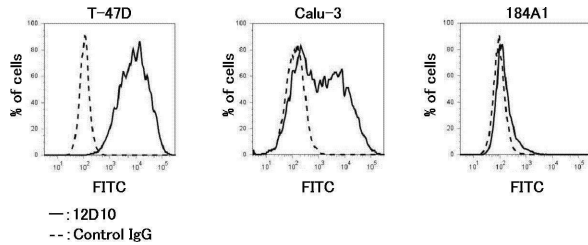
【 2 】



【 5 】



【 3 】



【配列表】

0005916017000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
G 0 1 N 33/531 (2006.01)		G 0 1 N 33/53		S
G 0 1 N 33/574 (2006.01)		G 0 1 N 33/531		A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		G 0 1 N 33/574		B
		C 1 2 P 21/08		

(72)発明者 大藪 巨樹
大阪府豊中市二葉町3丁目1番1号 塩野義製薬株式会社内

(72)発明者 高橋 竜也
大阪府豊中市二葉町3丁目1番1号 塩野義製薬株式会社内

(72)発明者 沼田 義人
大阪府豊中市二葉町3丁目1番1号 塩野義製薬株式会社内

(72)発明者 川本 敬子
大阪府豊中市二葉町3丁目1番1号 塩野義製薬株式会社内

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 J. Am. Chem. Soc., (2009), 131, [47], p.17102-17109
Glycobiology, (2007), 17, [2], p.197-209
Int. J. Cancer, (2000), 86, [5], p.702-712

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 9

C 0 7 K 1 6 / 1 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)

专利名称(译)	新型MUC1抗体		
公开(公告)号	JP5916017B2	公开(公告)日	2016-05-11
申请号	JP2012512681	申请日	2011-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人北海道大学		
申请(专利权)人(译)	塩野义制薬株式会社 国立大学法人北海道大学		
当前申请(专利权)人(译)	塩野义制薬株式会社 国立大学法人北海道大学		
[标]发明人	西村紳一郎 内藤正一 大藪巨樹 高橋竜也 沼田義人 川本敬子		
发明人	西村 紳一郎 内藤 正一 大藪 巨樹 高橋 竜也 沼田 義人 川本 敬子		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 A61K39/395 A61P35/00 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/574 C12P21/08		
CPC分类号	A61K2039/545 A61P35/00 C07K16/3092 C07K2317/34 C07K2317/73 G01N33/57484		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/18 A61K39/395.T A61P35/00 G01N33/53.V G01N33/53.S G01N33/531.A G01N33/574.B C12P21/08		
代理人(译)	杉田贤一		
优先权	2010104033 2010-04-28 JP		
其他公开文献	JPWO2011135869A5 JPWO2011135869A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的目的是提供对癌细胞具有高特异性的MUC1抗体。本发明人已经发现了可以在MUC1中特异性识别癌特异性糖链并且可以识别表达具有这种癌细胞特异性糖链的MUC1的癌细胞的目的。本发明提供抗体，其抗原结合片段或MUC1结合分子，与正常组织相关结构相比，对于MUC1的癌相关结构具有例如40倍或更高的特异性。 MUC1。

(21) 出願番号	特願2012-512681 (P2012-512681)	(73) 特許権者	000001926
(86) (22) 出願日	平成23年4月28日 (2011. 4. 28)		塩野義製菓株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2011/002520		大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号
(87) 国際公開番号	W02011/135869	(73) 特許権者	504173471
(87) 国際公開日	平成23年11月3日 (2011. 11. 3)		国立大学法人北海道大学
審査請求日	平成25年12月6日 (2013. 12. 6)		北海道札幌市北区北8条西5丁目
(31) 優先権主張番号	特願2010-104033 (P2010-104033)	(74) 代理人	100113789
(32) 優先日	平成22年4月28日 (2010. 4. 28)		弁理士 杉田 健一
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	西村 紳一郎
前置審査			北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大 学法人北海道大学内
		(72) 発明者	内藤 正一
			大阪府豊中市二葉町3丁目1番1号 塩野 義製菓株式会社内
			最終頁に続く