

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成31年3月28日(2019.3.28)

【国際公開番号】W02016/121695

【年通号数】公開・登録公報2017-043

【出願番号】特願2016-572021(P2016-572021)

【国際特許分類】

G 0 1 N 33/574 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/577 (2006.01)

【F I】

G 0 1 N 33/574 A

G 0 1 N 33/53 D

G 0 1 N 33/577 Z N A B

【手続補正書】

【提出日】平成31年1月23日(2019.1.23)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0037

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0037】

本発明のモノクローナル抗体の断片は、化学的に、又は組換えDNA法を用いることによって、合成したものであってもよい。例えば、組換えDNA法を用いて新たに合成された抗体断片が挙げられる。具体的には、限定はしないが、本発明のモノクローナル抗体の一以上のVL及び一以上のVHを適当な長さで配列を有するリンカーペプチド等を介して人工的に連結させた一量体ポリペプチド分子、又はその多量体ポリペプチドが該当する。このようなポリペプチドの例としては、一本鎖Fv(single chain Fragment of variable region)(Pierce catalog and Handbook、1994-1995、Pierce Chemical Co.、Rockford、IL参照)、ダイアボディ(diabody)、トリアボディ(triabody)又はテトラボディ(tetrabody)等の合成抗体等が挙げられる。免疫グロブリン分子において、VL及びVHは、通常別々のポリペプチド鎖(L鎖とH鎖)上に位置するが、一本鎖Fvは、これらの可変領域を十分な長さの柔軟性リンカーによって連結し、1本のポリペプチド鎖にVL及びVHを包含した構造を有する合成抗体断片である。一本鎖Fv内において両可変領域は、互いに自己集合して1つの機能的な抗原結合部位を形成することができる。一本鎖Fvは、それをコードする組換えDNAを、公知技術を用いてファージゲノムに組み込み、発現させることによって得ることができる。ダイアボディは、一本鎖Fvの二量体構造を基礎とした構造を有する分子である(Holliger et al.、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:6444-6448)。例えば、前記リンカーの長さが約12アミノ酸残基よりも短い場合、一本鎖Fv内の2つの可変部位は自己集合できないが、ダイアボディを形成させることにより、すなわち、2つの一本鎖Fvを相互作用させることにより、一方のFv鎖のVLが他方のFv鎖のVHと集合可能となり、2つの機能的な抗原結合部位を形成することができる(Marvin et al.、2005、Acta Pharmacol. Sin.、26:649-658)。さらに、一本鎖FvのC末端にシステイン残基を付加させることにより、2本のFv鎖同士のジスルフィド結合が可能となり、安定的なダイアボディを形成させることもできる(Alafsen et al.、2004、P

rot. Engr. Des. Sel., 17:21-27)。このようにダイアボディは二価の抗体断片であるが、それぞれの抗原結合部位が同一エピトープと結合する必要はなく、それぞれが異なるエピトープを認識し、特異的に結合する二重特異性を有していても構わない。トリアボディ、及びテトラボディは、ダイアボディと同様に一本鎖Fv構造を基本としたその三量体構造及び四量体構造を有する。それぞれ、三価、及び四価の抗体断片であり、多重特異性抗体であってもよい。さらに、本発明の抗体断片は、ファージディスプレイライブラリーを用いて同定された抗体断片(例えば、McCafferty et al., 1990, Nature, Vol. 348, 552-554参照)であって、かつ抗原結合能力を有しているものが含まれる。その他、例えば、Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., 1998, W. H. Freeman & Co., New Yorkも参照されたい。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0065

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0065】

抗APOA2モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ由来、例えば、上記「1-3-2(2)」の手法で取得した抗APOA2タンパク質末端モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ由来の抗体における可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列を用いて、VH及びVLの塩基配列を任意のヒトCH、及びヒトCLをコードする塩基配列にそれぞれ連結し、それぞれのポリヌクレオチドを適当な発現ベクターに組み込み、宿主細胞に導入後、完全な免疫グロブリン分子として発現させることもできる。また、CDRグラフト抗体技術を用いて、上記「1-3-2(2)」の手法で取得した抗APOA2タンパク質末端モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ由来の抗体における可変領域のアミノ酸配列のうち、各CDR配列のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドをヒトFR配列のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを所定の順序で連結し、適当な発現ベクターに組み込み、宿主細胞に導入後、完全な免疫グロブリン分子として発現させてもよい。このとき重鎖と軽鎖とが同一宿主細胞内で発現し、重鎖/軽鎖からなる二量体として産生できるようにすると便利である。具体的には、例えば、軽鎖発現ベクター及び重鎖発現ベクターにより細胞を共形質転換し、この形質転換細胞から本発明による抗体を得ることもできる。又は、上記可変領域のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドをそのまま適当な発現ベクターに組み込み、宿主細胞に導入後、免疫グロブリン分子の断片として発現させることもできる。あるいは、上述したように、前記アミノ酸配列を含むVL及びVH、又は軽鎖及び重鎖をそれぞれコードするポリヌクレオチドを適当なリンカーで連結してファージに組み込んだ一本鎖Fvとして、又はダイアボディ等の合成抗体断片として発現させてもよい。その他、近年開発された、遺伝子工学技術を活用して組換え抗体をファージ表面に発現させるファージディスプレイ抗体技術(Brinkmann et al., 1995, J. Immunol. Methods, 182, 41-50、国際公開W097/13844号、同90-02809号)により、人工的に重鎖、軽鎖をコードする遺伝子をシャッフリングさせ多様化した一本鎖Fv抗体をファージ融合タンパクとして発現させ、特異抗体を得ることもできる。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0069

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0069】

形質転換の宿主としては、上記「1-2. 免疫原の調製」に記載した宿主の他、SP2/0(マウスミエローマ)細胞(European Journal of Cancer

Prevention (1996) Vol. 5, 512 - 519 ; Cancer Research (1990) Vol. 50, 1495 - 1502) が好適に用いられる。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0119

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0119】

・数式1 : $a(APOA2 - ATQ) + b(APOA2 - AT) + d$

(式中、 a 、 b 、 d はゼロでない任意の実数、 $APOA2 - ATQ$ は、 $APOA2 - ATQ$ タンパク質の前記測定値、 $APOA2 - AT$ は、 $APOA2 - AT$ タンパク質の量の前記測定値を表す。)

本手法はAUC値 = 0.943を示し、比較例1及び2と比べて、非常に高い胆道癌判別精度を示すことが確かめられた。

(実施例3) 血中APOA2 - ATQタンパク質量と血中APOA2 - ATタンパク質量、及び血中APOA2 - ATQタンパク質量と血中APOA2 - ATタンパク質量の積を組み合わせた胆道癌の判別

APOA2タンパク質バリエーションであるAPOA2 - ATQタンパク質とAPOA2 - ATタンパク質の量の測定値と、その積を用いて、以下の統計処理により、健常者と胆道癌患者の判別を行った。目的変数として、胆道癌患者を「1」、健常者を「0」と定義し、比較例1及び比較例2で得られた2種のAPOA2タンパク質のバリエーション(APOA2 - ATQタンパク質とAPOA2 - ATタンパク質)の測定値とその積を説明変数としてロジスティック回帰分析を行い、判別式とAUC値を算出した。作成した判別式は以下に示す通りとなった。

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JPWO2016121695A5	公开(公告)日	2019-03-28
申请号	JP2016572021	申请日	2016-01-25
[标]申请(专利权)人(译)	东丽株式会社 NAT癌症CENT		
申请(专利权)人(译)	东丽株式会社 国家研究与发展研究所国家癌症研究中心		
[标]发明人	真田光彰 小林道元 高山愛子 笹島義志 鄭基晚 山田哲司 本田一文		
发明人	真田 光彰 小林 道元 高山 愛子 笹島 義志 鄭 基晚 山田 哲司 本田 一文		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/574 G01N33/577 C07K16/18 C07K2317/565 G01N33/57446 G01N2333/775		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/53.D G01N33/577.ZNA.B		
优先权	2015012667 2015-01-26 JP		
其他公开文献	JP6677655B2 JPWO2016121695A1		

摘要(译)

本发明提供了一种通过使用抗-APOA2抗体，用于该方法的抗-APOA2抗体和含有该抗体的胆道癌，通过测量受试者样品中APOA2蛋白的变体的量来检测胆道癌的方法。提供一个工具包。