

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02011/081189

発行日 平成25年5月13日(2013.5.13)

(43) 国際公開日 平成23年7月7日(2011.7.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 16/42 (2006.01)	C07K 16/42	4B064
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4B065
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4C085
C12N 15/02 (2006.01)	C12N 15/00 C	4H045
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 59 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2011-547720 (P2011-547720)	(71) 出願人 000001029 協和発酵キリン株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2010/073737	
(22) 国際出願日 平成22年12月28日(2010.12.28)	
(31) 優先権主張番号 特願2009-296706 (P2009-296706)	(72) 発明者 金子 悦士 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和発酵キリン株式会社 バイオ医薬研究所内
(32) 優先日 平成21年12月28日(2009.12.28)	(72) 発明者 佐々木 由香 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和発酵キリン株式会社 本社内
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(72) 発明者 森 勝弘 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和発酵キリン株式会社 本社内
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗IgA1抗体

(57) 【要約】

本発明の目的は、IgA腎症の診断に有効な、ガラクトースが結合していないセリンスレオニン結合型糖鎖を含む免疫グロブリンA1の重鎖遺伝子によりコードされるポリペプチドのヒンジ領域を特異的に認識し、結合するモノクローナル抗体が求められている。

本発明により、ガラクトースが結合していないセリンスレオニン結合型糖鎖を含む免疫グロブリンA1の重鎖遺伝子によりコードされるポリペプチドのヒンジ領域を特異的に認識し、結合するモノクローナル抗体または該抗体断片、該抗体または抗体断片を用いる診断薬、および該抗体または抗体断片を有効成分として含有する治療薬を提供することができる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ガラクトースが結合していないセリン/スレオニン結合型糖鎖（以下、O結合型糖鎖）を含む、免疫グロブリンA1の重鎖遺伝子によってコードされるポリペプチド（以下、IgA1重鎖）のヒンジ領域を特異的に認識し、結合するモノクローナル抗体または該抗体断片。

【請求項 2】

O結合型糖鎖が結合した、IgA1重鎖遺伝子によってコードされるポリペプチドのヒンジ領域のうち、ガラクトースが結合したO結合型糖鎖を含むIgA1重鎖のヒンジ領域は認識せず、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むIgA1重鎖のヒンジ領域を認識し、結合するモノクローナル抗体または該抗体断片。

10

【請求項 3】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖が、 α -N-アセチルガラクトサミン-セリン/スレオニン（以下、Tn抗原）またはシアリルTn抗原から選ばれる少なくとも1つのO結合型糖鎖である、請求項 1 または 2 に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

【請求項 4】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖がTn抗原である、請求項 3 に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

【請求項 5】

モノクローナル抗体が、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含むIgA1重鎖のヒンジ領域を特異的に認識し、結合する抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

20

【請求項 6】

モノクローナル抗体が、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含むIgA1重鎖のヒンジ領域ポリペプチドであり、該ポリペプチドのアミノ末端から 3 番目のスレオニン、6 番目のスレオニン、8 番目のセリン、10 番目のセリン、14 番目のスレオニンから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基にガラクトースを有さないN-アセチルガラクトサミンが結合した糖ペプチドを特異的に認識し、結合する抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

【請求項 7】

モノクローナル抗体が、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含む補体C1インヒビターに交差反応性を示さないモノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

30

【請求項 8】

モノクローナル抗体が、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むIgA1重鎖のヒンジ領域への結合において、モノクローナル抗体KM4137、KM4140、KM4144から選ばれる少なくとも1つのモノクローナル抗体と競合反応するモノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

【請求項 9】

モノクローナル抗体が、モノクローナル抗体KM4137、KM4140、KM4144から選ばれる少なくとも1つのモノクローナル抗体が結合する、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むIgA1重鎖のヒンジ領域に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

40

【請求項 10】

モノクローナル抗体が、ハイブリドーマKM4137（FERM BP-11214）、KM4140（FERM BP-11215）、KM4144（FERM BP-11216）から選ばれる少なくとも1つのハイブリドーマから生産されるモノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体断片。

【請求項 11】

モノクローナル抗体が、遺伝子組換え抗体である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片。

50

【請求項 1 2】

遺伝子組換え抗体が、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体から選ばれる抗体である、請求項 1 1 に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

【請求項 1 3】

抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体(scFv)、二量体化V領域(Diabody)、ジスルフィド安定化V領域(dsFv)およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の抗体断片。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ。

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片をコードするDNA。

【請求項 1 6】

請求項 1 5 に記載のDNAを含有する組換え体ベクター。

【請求項 1 7】

請求項 1 6 に記載の組換え体ベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

【請求項 1 8】

請求項 1 4 に記載のハイブリドーマまたは請求項 1 7 に記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片を生成蓄積させ、該培養物から抗体または該抗体断片を採取することを特徴とする請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片の製造方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片を用いる、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有するIgA1の免疫学的検出または測定方法。

【請求項 2 0】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片を用いる、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有するIgA1の検出試薬。

【請求項 2 1】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片を用いる、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有するIgA1が関与する疾患の診断薬。

【請求項 2 2】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有するIgA1が関与する疾患が自己免疫疾患である、請求項 2 1 に記載の診断薬。

【請求項 2 3】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有するIgA1が関与する疾患がIgA腎症である、請求項 2 1 に記載の診断薬。

【請求項 2 4】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体断片を有効成分として含有する、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有するIgA1が関与する疾患の治療薬。

【請求項 2 5】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有するIgA1が関与する疾患が自己免疫疾患である、請求項 2 4 に記載の治療薬。

【請求項 2 6】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有するIgA1が関与する疾患がIgA腎症である、請求項 2 4 に記載の治療薬。

【請求項 2 7】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片を用いて、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有するIgA1を検出または測定することを、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有するIgA1が関与

10

20

30

40

50

する疾患の診断方法。

【請求項 28】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有するIgA1が関与する疾患が自己免疫疾患である、請求項 27 に記載の診断方法。

【請求項 29】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有するIgA1が関与する疾患がIgA腎症である、請求項 27 に記載の診断方法。

【請求項 30】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有するIgA1が関与する疾患の治療薬を製造するための、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片の使用。 10

【請求項 31】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有するIgA1が関与する疾患が自己免疫疾患である、請求項 30 に記載の抗体または該抗体断片の使用。

【請求項 32】

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有するIgA1が関与する疾患がIgA腎症である、請求項 30 に記載の抗体または該抗体断片の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】 20

本発明は、ガラクトースが結合していないセリンスレオニン結合型糖鎖を含む免疫グロブリンA1の重鎖遺伝子によりコードされるポリペプチドのヒンジ領域を特異的に認識し、結合するモノクローナル抗体または該抗体断片、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体をコードするDNA、該DNAを含んでなるベクター、該ベクターを形質転換して得られる形質転換体、該ハイブリドーマまたは形質転換体を用いる抗体または該抗体断片の製造方法、該抗体または抗体断片を用いる診断薬、および該抗体または抗体断片を有効成分として含有する治療薬に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、種々の疾患の発症や病態の進行に伴い、その疾患や病態に関わる細胞が発現するタンパク質に付加された糖鎖構造に変化が起こる事例が報告されている。この事例のなかで代表的なものは、80%を超えるヒトの癌種において発現が認められるO結合型（セリンスレオニン型）糖鎖抗原の1つであるTn抗原（Thomsen抗原、CD175抗原）と、このTn抗原にシアル酸が付加されたシアリルTn抗原（CD175s抗原）の発現である（非特許文献2）。これらの糖鎖抗原は正常細胞にはほとんど発現が認められないことが知られており、癌特異的ワクチン療法の標的分子として医療に応用するための研究がなされている（非特許文献1）。これらの癌特異的な糖鎖抗原の発現は、生体内に存在する複雑な糖鎖生合成経路と糖鎖代謝経路を構成する酵素活性により制御されている。その一例として、癌細胞において、糖鎖生合成経路に関与するタンパク質をコードする遺伝子の発現様式が変化した結果、糖鎖生合成経路が途中で遮断される例などが知られている。Tn抗原は、正常細胞におけるO結合型糖鎖の生合成経路の中間産物として知られており、タンパク質アミノ酸配列中の特定のセリン（Ser）残基またはスレオニン（Thr）残基の側鎖に存在する水酸基に、N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）が結合した構造である（GalNAc-Ser/Thr）。このTn抗原の非還元末端側に、コア1 3ガラクトース転移酵素（core1 3Gal-T, T-synthetase）の活性によってガラクトースが1分子付加されることにより、TF抗原（Thomsen-Friedenreich抗原、CD176抗原）などの正常型のO結合型糖鎖の生合成が進行する。複数種の癌細胞株において、細胞内のコア1 3ガラクトース転移酵素の活性が低下した結果、糖鎖の生合成経路が遮断され、Tn抗原あるいはシアリルTn抗原が発現すると考えられている。癌細胞内でコア1 3ガラクトース転移酵素の活性が低下する機構は複雑であり、現在でも完全には解明されていない。しかし、その機構のひとつに、コア1 3ガラクトース転移酵 30 40 50

素の活性発現に必要な特定のシャペロンタンパク質 (Cosmc) をコードする遺伝子が変異した結果、細胞内のコア1-3ガラクトース転移酵素活性が大幅に低下する、という機構が推定されている (非特許文献6)。複数の癌種で共通してTn抗原の発現が認められることから、細胞内の糖鎖合成経路や糖鎖代謝経路における異常は、その細胞内で発現する多くの異なる糖タンパク質に付加した糖鎖構造に共通した変化を生じさせる主たる原因と考えられている。

【0003】

糖鎖構造の変化と病態の進行が密接に関わっていることが知られている代表的な疾患は癌である。また、癌以外に糖鎖構造の変化と病態の進行が密接に関わっていることが知られている疾患として、IgA腎症が知られている。IgA腎症とは、免疫グロブリンの一種であるイムノグロブリンA (IgA) が腎系球体のメサンギウム領域に顆粒状に沈着した病理像が特徴的な慢性系球体腎炎であり、1968年にBergerによって初めて報告された (非特許文献2)。この疾患は、日本国内の慢性系球体腎炎患者数の約半数を占める代表的な腎炎である。IgA腎症と診断された患者の約4割はその後20年以内に末期腎不全に移行し、人工透析や腎移植を余儀なくされるといわれている。このようにIgA腎症は一般的に予後不良の疾患として認識されているにもかかわらず、臨床で有効性が証明された治療法は未だ確立していない。IgA腎症の患者体内では、2種類のIgAアイソタイプ (IgA1とIgA2) のうち、主にIgA1が腎臓に沈着することが知られている。また、その沈着の原因のひとつとして、ヒトIgA1分子特異的に存在するヒンジ領域に付加されたO結合型糖鎖の構造が、正常型からTn抗原あるいはシアリルTn抗原に変化していることが報告されている (非特許文献3、非特許文献4)。IgA1ヒンジ領域に付加したO結合型糖鎖からガラクトースが欠損してTn抗原あるいはシアリルTn抗原に変化すると、IgA1分子の自己凝集能が亢進すること、この糖鎖不全型IgA1を特異的に認識する自己抗体と結合し免疫複合体を形成すること、ならびに、凝集体あるいは免疫複合体となったIgA1分子は通常循環血におけるクリアランス機構を回避し腎メサンギウム領域へ沈着することが証明されている (非特許文献5)。さらに、IgA腎症患者から単離したIgA産生細胞において、Cosmcの発現量低下に起因したコア1-3ガラクトース転移酵素活性の低下が報告されている (非特許文献6)。すなわち、IgA腎症患者体内のIgA産生細胞では糖鎖合成経路が途中で遮断された結果、正常型糖鎖を持つIgA1の産生ができなくなり、代わりに糖鎖不全型のIgA1が産生される。IgA腎症の発症機構のひとつとして、この糖鎖不全型IgA1を含む複合体が腎系球体に沈着した結果、腎組織における炎症が惹起されるという機構が提唱されている。

【0004】

一般的にIgAは、血液中あるいは組織内のB細胞、あるいは、B細胞から分化した形質細胞 (別名: プラズマ細胞) によって産生される。形質細胞は、B細胞分化の最終段階であり、二次リンパ組織、全身の粘膜組織、骨髄などに分布して大量の抗体を産生するが、IgAを産生する形質細胞は、主に粘膜組織に分布することが知られている。一方、二次リンパ組織の胚中心において、高親和性のIgA抗体産生能を獲得したB細胞クローンからは、メモリーB細胞あるいは、形質細胞が分化し、全身の標的臓器に分布して長期にわたり抗体を産生し続けることが知られている。しかしながら、IgA腎症の発症に関与する糖鎖不全型IgAを産生する細胞が、B細胞分化過程のどの段階で発生するのか、また糖鎖不全IgAを産生するB細胞あるいは形質細胞が、体内のどの組織に分布するのかについては、明らかにされていない。

【0005】

IgA腎症患者の約半数は血中IgA値が上昇していることが知られている (非特許文献7)。さらに、IgA腎症患者において共通して見られる現象として、末梢血や尿などの体液、および腎系球体において、健常人には一般にほとんど認められない糖鎖不全型IgA1が検出されることが知られている (非特許文献8)。この糖鎖不全型IgA1、つまりガラクトース欠損型IgA1はIgA腎症の病態進行に寄与する因子であることは上述した通りであるが、近年、IgA腎症以外の幾つかのヒト疾患、たとえば、アレルギー疾患であるヘノッホ・シェンライン紫斑病 (Henoch-Schonlein purpura)、自己免疫疾患である全身性エリテマトー

10

20

30

40

50

デス、あるいは、癌であるIgA1型骨髄腫の一部においても、この糖鎖不全型IgA1の出現と腎への蓄積が腎機能の低下を招くことが明らかとなっている（非特許文献8）。このような背景から、糖鎖不全型IgA1は、IgA腎症をはじめとした特定のヒト疾患におけるバイオマーカー、たとえば、診断バイオマーカー、予測バイオマーカー、あるいは、薬力学的バイオマーカーとして認識されつつある。

【0006】

ヒトIgA1のヒンジ領域を、IgA1重鎖ポリペプチドのアミノ酸配列番号として厳密に定義することは困難である。一般的には、IgA1分子を構成する重鎖ポリペプチドにおいて、CH1ドメインとCH2ドメインとの間に位置する領域を指す。一般的な分泌型ヒトIgA1分子を構成する重鎖ポリペプチド（配列番号2）においては、N末端から223番目のプロリンから始まり240番目のセリン、あるいは241番目のシステインまでの領域を指すことが多い。この領域はIgA1ヒンジ領域コアペプチドとも呼ばれる。これまでの研究で、この領域においてO結合型糖鎖が付加されるアミノ酸残基は同定されており、225番目のスレオニン、228番目のスレオニン、230番目のセリン、232番目のセリン、236番目のスレオニンの5箇所が知られている。なお、N結合型糖鎖はヒンジ領域には結合せず、IgA1分子を構成する重鎖ポリペプチドにおいて、263番目のアスパラギンと459番目のアスパラギンに結合することが知られている。

【0007】

現行のIgA腎症の確定診断法である腎生検（バイオプシー）は患者に精神的苦痛、腎周囲出血リスク、および数日間の入院に伴う経済的負担を与える方法である。これまでに、糖鎖不全型IgA1を直接検出し分析することを目的としたいくつかの実験手法が検討されている。Tn型糖鎖やシアリルTn型糖鎖を認識し結合するレクチン、たとえばVicia villosa由来レクチン、Vatairea macrocarpa由来レクチン、大豆由来レクチン、Helixaspera由来レクチン、あるいはCaragana arborescens由来レクチン等を用いたELISA法やウエスタンブロット法等の免疫学的手法は簡便な手法のひとつであるが（非特許文献9）、これらレクチンは糖鎖構造のみを認識して結合する性質を有するため、ヒト由来試料などのサンプルに含まれる、IgA1以外のO結合型糖鎖を有する糖蛋白質（ムチン類、補体C1インヒビターなど）に対しても、非選択的に結合してしまうという問題点がある。また、抗Tnモノクローナル抗体、たとえば、MLS128、22-1-1、HBTn1あるいはBric111等を用いたELISAやウエスタンブロット等の免疫学的手法も、簡便な手法のひとつではあるが、上記レクチン法と同様に特異性が低いという問題点がある（非特許文献10）。一方、ヒト由来試料などのサンプルから精製抽出したIgA1をグリカナーゼやペプチダーゼなど種々の酵素で処理して得られる糖鎖や糖ペプチドの混合物をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計（MALDI-TOF MS）等で解析する手法は、特異性と検出感度が比較的高いことが特長である（非特許文献11）。しかし、この方法は蛋白質の精製、酵素処理、装置分析の工程が必要なことから簡便とは言い難く、また定量性にも乏しいという課題がある。このように、ヒト由来試料などのサンプル中に含まれる糖鎖不全IgA1を特異的に、簡便に、かつ定量的に検出あるいは測定可能な手法は知られていない。また、上述した糖鎖不全型IgA1産生細胞は、その細胞内あるいは細胞表面に糖鎖不全型IgA1を発現あるいは蓄積していると考えられるが、このような細胞を特異的かつ簡便に検出可能な手法も知られていない。

【0008】

比企らの方法（特許文献1）は、まず、正常型のO結合型糖鎖であるTF抗原（Thomsen-Friedenreich抗原、CD176抗原）を認識する植物レクチンであるジャカリンを固定化したELISAプレート上に正常型IgA1をキャプチャーさせたELISAプレートを作製する。次に、患者由来試料からIgA1を精製し、これをビオチン等で標識してからこのELISAプレートに添加し、予めプレート上にキャプチャーさせた正常型IgA1との自己凝集反応を利用して糖鎖不全型IgA1をプレート上に結合させる。この方法の課題は定量性の乏しさである。なぜなら、IgA1ヒンジ領域の糖鎖不全の度合いと自己凝集性の強さとの相関性は不明であり、また患者由来IgA1の標識による変性が凝集性に与える影響が排除できないためである。ま

10

20

30

40

50

た、試料からIgA1を精製する必要があることから簡便性の点でも問題がある方法といわざるを得ない。

【0009】

成田らの方法(特許文献2)は患者由来IgA1を精製単離する必要が無いので、上記の方法に比べて簡便な方法である。方法としては、連鎖球菌由来IgA結合ペプチドSAPを固定化したELISAプレートを作製し、そこに患者由来試料を添加しIgAをプレートにキャプチャーさせる。その後、N-アセチルガラクトサミンを認識する植物レクチン(Vicia Villosa B4 lectin; VVL)の標識体を添加することにより、糖鎖不全型IgA1を検出する方法である。しかし、VVLはセリン/スレオニンに結合したN-アセチルガラクトサミン以外にも、N結合型糖鎖に含まれるガラクトースの非還元末端に結合したN-アセチルガラクトサミンに結合することから、この成田らの方法はIgA1ヒンジ領域のO結合型糖鎖の構造変化を特異的に検出する方法ではない。比企らの別の方法(特許文献3)は、患者由来血清を、ジャカリンアガロースを充填したカラムに通塔してIgA1を単離後、そのIgA1をELISAプレートに固定化し、次に、IgA1ヒンジ領域のアミノ酸配列を有する合成ペプチド(PVPSTPPTPSPS TPPTPSPS)に対するウサギ由来ポリクローナル抗体をそのELISAプレートに添加し、最後に標識された抗ウサギIgG抗体を用いて検出する方法である。この方法は、患者由来血清に含まれる、ヒンジ領域のO型糖鎖を完全に欠損したIgA1を検出する方法であり、Tn型糖鎖をヒンジ領域に有する糖鎖不全型IgA1を特異的に検出する方法ではない。また、IgA1の精製にTF抗原特異的なレクチンであるジャカリンを用いているため、患者血清中に含まれる糖鎖不全型IgA1の回収が不完全である。

10

20

【0010】

糖鎖不全型IgA1を直接検出する方法ではないが、患者由来試料をELISA法によって分析し、IgA腎症を診断しようという試みも検討されている。日本特許第4197393号に記載の方法は、IgA1ヒンジ領域のアミノ酸配列を有する合成ペプチド(PVPSTPPTPSPSTPPTPSPSC)をウシ血清アルブミンに連結させ作製した蛋白質を固定化したELISAプレートを作製し、そこに患者由来試料を添加する方法である。この方法は、IgA1ヒンジ領域に特異的に結合する自己抗体(IgG型)がプレートにキャプチャーされ、最後に抗ヒトIgG抗体の標識体を添加することによってその自己抗体を検出することが可能である。しかしながら、この方法ではTn型糖鎖をヒンジ領域に有するIgA1ではなく、ヒンジ領域のO型糖鎖を完全に欠損したIgA1に結合するIgG型の自己抗体を検出しているに過ぎない。

30

【0011】

IgA1を特異的に認識するモノクローナル抗体としては、ヒトIgA1重鎖蛋白質をマウスに免疫することにより得られたB3506B4抗体、または、ヒト母乳由来IgA1をマウスに免疫することにより得られた3C10抗体などが報告されている(非特許文献12)。

B3506B4抗体や3C10抗体は、正常糖鎖型IgA1に対しても親和性を有することが示されている。これまでにガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むIgA1分子を特異的に認識するような抗体は知られていない。

【0012】

一般に非ヒト抗体、例えばマウス抗体などをヒトに投与すると、異物として認識されることにより、ヒト体内にマウス抗体に対するヒト抗体(Human Anti Mouse Antibody:HAMA)が誘導されることが知られている。HAMAは投与されたマウス抗体と反応し、副作用を引き起こしたり(非特許文献13~16)、マウス抗体の体内からの消失を速め(非特許文献17~19)、マウス抗体の治療効果を低下させてしまうことが知られている(非特許文献20,21)。

40

【0013】

これらの問題点を解決するため、遺伝子組換え技術を利用して非ヒト抗体からヒト型キメラ抗体やヒト化抗体の作製が試みられている。

ヒト化抗体は、マウス抗体などの非ヒト抗体と比較して、ヒトへの投与を行う上で、様々な利点を有している。例えば、サルを用いた実験でマウス抗体に比べ免疫原性が低下し、血中半減期が延長したことが報告されている(非特許文献22、非特許文献23)。すなわ

50

ち、ヒト化抗体は、非ヒト抗体に比べ、ヒトにおいて副作用が少なく、その治療効果が長期間持続することが期待される。

【0014】

また、ヒト化抗体は、遺伝子組換え技術を利用して作製するため、様々な形態の分子として作製することができる。例えば、ヒト抗体の重鎖（以下、H鎖と表記する）定常領域（以下、C領域と表記する）（H鎖C領域を、CHと表記する）として 1サブクラスを使用すれば、抗体依存性細胞傷害活性（以下、ADCC活性と表記する）などのエフェクター機能の高いヒト化抗体を作製することができ（非特許文献24）、かつ、マウス抗体に比べ血中半減期の延長が期待される（非特許文献25）。特にヒト体内から、Tn抗原型IgA1を細胞表面上に発現したTn抗原型IgA1産生細胞を除去する治療においては、抗体を介してエフェクター細胞を標的細胞の近傍に集積させ、標的細胞を特異的に傷害するために、抗体のFc領域（抗体重鎖のヒンジ領域以降の領域）を介した補体依存性細胞傷害活性（以下、CDC活性と表記する）やADCC活性等の細胞傷害活性が重要である。ヒトの治療においては、細胞傷害活性を発揮させるために、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト化抗体を用いることが望ましい（非特許文献26、27）。

10

【0015】

さらに、ヒト化抗体は、最近のタンパク質工学、遺伝子工学の進歩により、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体（以下、scFvと表記する）（非特許文献28）、2量体化V領域断片（以下、Diabodyと表記する）（非特許文献29）、ジスルフィド安定化V領域断片（以下、dsFvと表記する）（非特許文献30）、CDRを含むペプチド（非特許文献31）などの、分子量の小さい抗体断片としても作製でき、これらの抗体断片は、完全な抗体分子に比べ、標的組織への移行性に優れている（非特許文献32）。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0016】

【特許文献1】特開平9-311132号公報

【特許文献2】特開2007-24661号公報

【特許文献3】特開平10-111290号公報

【非特許文献】

【0017】

【非特許文献1】CritRevOncog.,6,57(1995)

【非特許文献2】J Urol Nephrol.,74,694(1968)

【非特許文献3】ClinExpImmunol.,100,470(1995)

【非特許文献4】J AmSocNeph.,7,955(1996)

【非特許文献5】NephrolDialTransplant.,17,50(2002)

【非特許文献6】JInternMed.,258,467(2005)

【非特許文献7】日本腎臓学会誌 44(7),514-523(2002)

【非特許文献8】Seminars inNephrology28(1), 78 (2008)

【非特許文献9】JBC 282, 28256, 2007 ;Kidney Int. 1997 52:509

【非特許文献10】ChemBioChem 6,22292005

【非特許文献11】CarbohydrateResearch339(13), 2329-2355 (2004)

【非特許文献12】Clinical&Experimental Immunology 79(1), 35-40 (1990)

【非特許文献13】Hum.Pathol.,38,564(2007)

【非特許文献14】Hum.Pathol.,36,886(2005)

【非特許文献15】FEBSLett.,579,6179(2005)

【非特許文献16】CancerRes.,65,7378(2005)

【非特許文献17】Hum.Pathol.,36,886(2005)

【非特許文献18】Oncogene,13,2328(2006)

【非特許文献19】VirchowsArch.,448,52(2006)

【非特許文献20】J.Immunol.,135,1530(1985)

30

40

50

- 【非特許文献 2 1】CancerRes.,46,6489(1986)
- 【非特許文献 2 2】CancerRes.,56,1118(1996)
- 【非特許文献 2 3】Immunol.,85,668(1995)
- 【非特許文献 2 4】CancerRes.,56,1118(1996)
- 【非特許文献 2 5】Immunol.,85,668(1995)
- 【非特許文献 2 6】J.Immunol.,144,1382(1990)
- 【非特許文献 2 7】Nature,322,323(1988)
- 【非特許文献 2 8】Science,242,423(1988)
- 【非特許文献 2 9】NatureBiotechnol.,15,629(1997)
- 【非特許文献 3 0】MolecularImmunol.,32,249(1995)
- 【非特許文献 3 1】J.Biol.Chem.,271,2966(1996)
- 【非特許文献 3 2】CancerRes.,52,3402(1992)

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

本発明の目的はガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むIgA1を特異的に認識し結合するモノクローナル抗体またはその使用方法を提供することにある。

ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むIgA1を特異的に認識し結合するモノクローナル抗体またはその使用方法が求められている。

【課題を解決するための手段】

20

【0019】

本発明は、(1)~(32)に関する。

(1)ガラクトースが結合していないセリン/スレオニン結合型糖鎖(以下、O結合型糖鎖)を含む、免疫グロブリンA1の重鎖遺伝子によってコードされるポリペプチド(以下、IgA1重鎖)のヒンジ領域を特異的に認識し、結合するモノクローナル抗体または該抗体断片。

(2)O結合型糖鎖が結合した、IgA1重鎖遺伝子によってコードされるポリペプチドのヒンジ領域のうち、ガラクトースが結合したO結合型糖鎖を含むIgA1重鎖のヒンジ領域は認識せず、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むIgA1重鎖のヒンジ領域を認識し、結合するモノクローナル抗体または該抗体断片。

30

(3)ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖が、-N-アセチルガラクトサミン-セリン/スレオニン(以下、Tn抗原)またはシアリルTn抗原から選ばれる少なくとも1つのO結合型糖鎖である、(1)または(2)に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(4)ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖がTn抗原である、(3)に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(5)モノクローナル抗体が、配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むIgA1重鎖のヒンジ領域を特異的に認識し、結合する抗体である、(1)~(4)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(6)モノクローナル抗体が、配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むIgA1重鎖のヒンジ領域ポリペプチドであり、該ポリペプチドのアミノ末端から3番目のスレオニン、6番目のスレオニン、8番目のセリン、10番目のセリン、14番目のスレオニンから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基にガラクトースを有さないN-アセチルガラクトサミンが結合した糖ペプチドを特異的に認識し、結合する抗体である、(1)~(4)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

40

(7)モノクローナル抗体が、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含む補体C1インヒビターに交差反応性を示さないモノクローナル抗体である、(1)~(4)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(8)モノクローナル抗体が、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むIgA1重鎖のヒンジ領域への結合において、モノクローナル抗体KM4137、KM4140、KM4144から選ばれる少なくとも1つのモノクローナル抗体と競合反応するモノクローナル抗体である、(

50

- 1) ~ (4) のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。
- (9) モノクローナル抗体が、モノクローナル抗体から選ばれる少なくとも 1 つのモノクローナル抗体が結合する、ガラクトースが結合していない O 結合型糖鎖を含む IgA1 重鎖のヒンジ領域に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体である、請求項 (1) ~ (4) のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。
- (10) モノクローナル抗体が、ハイブリドーマ KM4137 (FERM BP-11214)、KM4140 (FERM BP-11215)、KM4144 (FERM BP-11216) から選ばれる少なくとも 1 つのハイブリドーマから生産されるモノクローナル抗体である、請求項 (1) ~ (9) のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体断片。
- (11) モノクローナル抗体が、遺伝子組換え抗体である、(1) ~ (9) のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片。 10
- (12) 遺伝子組換え抗体が、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体から選ばれる抗体である、(11) に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。
- (13) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体 (scFv)、二量体化 V 領域 (Diabody)、ジスルフィド安定化 V 領域 (dsFv) および CDR を含むペプチドから選ばれる抗体断片である (1) ~ (12) のいずれか 1 項に記載の抗体断片。
- (14) (1) ~ (9) のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ。
- (15) (1) ~ (13) のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片をコードする DNA。 20
- (16) (15) に記載の DNA を含有する組換え体ベクター。
- (17) (16) に記載の組換え体ベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。
- (18) (14) に記載のハイブリドーマまたは (17) に記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に (1) ~ (13) のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片を生成蓄積させ、該培養物から抗体または該抗体断片を採取することを特徴とする (1) ~ (13) のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片の製造方法。
- (19) (1) ~ (13) のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片を用いる、ガラクトースが結合していない O 結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有する IgA1 の免疫学的検出または測定方法。
- (20) (1) ~ (13) のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片を用いる、ガラクトースが結合していない O 結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有する IgA1 の検出試薬。 30
- (21) (1) ~ (13) のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片を用いる、ガラクトースが結合していない O 結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有する IgA1 が関与する疾患の診断薬。
- (22) ガラクトースが結合していない O 結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有する IgA1 が関与する疾患が自己免疫疾患である、(21) に記載の診断薬。
- (23) ガラクトースが結合していない O 結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有する IgA1 が関与する疾患が IgA 腎症である、(21) に記載の診断薬。
- (24) (1) ~ (13) のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体断片を有効成分として含有する、ガラクトースが結合していない O 結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有する IgA1 が関与する疾患の治療薬。 40
- (25) ガラクトースが結合していない O 結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有する IgA1 が関与する疾患が自己免疫疾患である、(24) に記載の治療薬。
- (26) ガラクトースが結合していない O 結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有する IgA1 が関与する疾患が IgA 腎症である、(24) に記載の治療薬。
- (27) (1) ~ (13) のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片を用いて、ガラクトースが結合していない O 結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有する IgA1 を検出または測定することを含む、ガラクトースが結合していない O 結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有する IgA1 が関与する疾患の診断方法。
- (28) ガラクトースが結合していない O 結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有する IgA1 が関 50

与する疾患が自己免疫疾患である、(27)に記載の診断方法。

(29)ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有するIgA1が関与する疾患がIgA腎症である、(27)に記載の診断方法。

(30)ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有するIgA1が関与する疾患の治療薬を製造するための、(1)~(13)のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片の使用。

(31)ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有するIgA1が関与する疾患が自己免疫疾患である、(30)に記載の抗体または該抗体断片の使用。

(32)ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むヒンジ領域を有するIgA1が関与する疾患がIgA腎症である、(30)に記載の抗体または該抗体断片の使用。

10

【発明の効果】

【0020】

本発明により、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含む免疫グロブリンA1の重鎖遺伝子によりコードされるポリペプチドのヒンジ領域を特異的に認識し、結合するモノクローナル抗体を提供することができる。また、本発明により、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含む免疫グロブリンA1の重鎖遺伝子によりコードされるポリペプチドのヒンジ領域が関与する各種疾患の治療薬または診断薬を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】プラスミドpCR2B8PVHの構築フローを示した図である。

20

【図2】プラスミドpCR1gAの構築フローを示した図である。

【図3】プラスミドpCRm1gAの構築フローを示した図である。

【図4】プラスミドpCR2B8Pm1gAの構築フローを示した図である。

【図5】プラスミドpKAN932B8PVHm1gAの構築フローを示した図である。

【図6】m1gA1-FcのSDSポリアクリルアミド電気泳動を示した図である。

【図7】m1gA1-FcのO結合型糖鎖構造をELISA法で解析した図である。縦軸はサンプル波長415nm、リファレンス波長490nmにおける平均蛍光強度(OD415-OD490)を、凡例中の値は競合物質濃度($\mu\text{g/ml}$)を示す。

【図8】樹立したモノクローナル抗体の結合特異性をELISA法で解析した図である。縦軸はELISAの吸光度で、欄外に示した各固定化抗原に対する結合性を示す。

30

【図9】樹立したモノクローナル抗体の結合特異性を競合ELISA法で解析した図である。上段は、Tn抗原型ヒトIgA1、下段は、ヒト血漿由来のIgA1が競合物質である。縦軸は吸光度、横軸は競合物質の濃度($\mu\text{g/ml}$)を示す。

【図10】樹立したモノクローナル抗体の結合特異性をフローサイトメトリーで解析した図で、上段はm1gA1発現DG44細胞株、下段はm1gA1発現Lec8細胞株への結合を確認した図である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。

【図11】樹立したモノクローナル抗体を用いて構築したサンドイッチELISA法による糖鎖不全型IgA1の定量結果を示す。縦軸は吸光度、横軸は抗原の濃度($\mu\text{g/ml}$)を示す。

【図12】ビオチンラベルした抗Tn抗原付加mIgAヒンジペプチドモノクローナル抗体KM4137(a)、KM4140(b)またはKM4144(c)とTn抗原型ヒトIgA1の結合に対する、KM4137()、KM4140()およびKM4144()の競合阻害活性をフローサイトメーター(FCM)で測定した結果を示す。縦軸はサンプル波長415nm、リファレンス波長490nmにおける平均蛍光強度(OD415-OD490)を、横軸は競合物質濃度($\mu\text{g/ml}$)を示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0022】

本発明は、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含む免疫グロブリンA1の重鎖遺伝子によりコードされるポリペプチドのヒンジ領域を特異的に認識し、結合するモノクローナル抗体に関する。免疫グロブリンA1の重鎖遺伝子としては、免疫グロブリンA1の重鎖をコードする遺伝子であればいずれでもよいが、一例としては、分泌型免疫グロブリンA1重鎖定常領域のアミノ酸配列(配列番号2)をコードする塩基配列(配列番号3)を含

50

む遺伝子があげられる。また、配列番号3で示される塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつIgA1重鎖の機能を有するポリペプチドをコードする遺伝子なども本発明のIgA1重鎖遺伝子に包含される。

【0023】

ストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、配列番号3で示される塩基配列を有するDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法、サザンブロット・ハイブリダイゼーション法、DNAマイクロアレイ法などにより得られるハイブリダイズ可能なDNAを意味し、具体的には、ハイブリダイズしたコロニーまたはブランク由来のDNA、もしくは該配列を有するPCR産物もしくはオリゴDNAを固定化したフィルターまたはスライドガラスを用いて、0.7~1.0 mol/Lの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150 mmol/L塩化ナトリウム、15 mmol/Lクエン酸ナトリウムを含む）を用い、65℃条件下でフィルターもしくはスライドガラスを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, 1987-1997)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition (Oxford University, 1995)]などに記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとしては、配列番号3で示される塩基配列と少なくとも60%以上の同一性を有するDNA、好ましくは80%以上の同一性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の同一性を有するDNAをあげることができる。

10

20

【0024】

真核生物のタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列には、しばしば遺伝子の多型が認められる。本発明において用いられるIgA1重鎖遺伝子には、遺伝子の多型によって塩基配列にわずかに変異を生じた遺伝子も包含される。

IgA1重鎖としては、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号2で示されるアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつIgA1重鎖の機能を有するポリペプチド、ならびに配列番号2で示されるアミノ酸配列と60%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつIgA1重鎖の機能を有するポリペプチドなどがあげられる。

30

【0025】

配列番号2で示されるアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, 1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)]などに記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより得ることができる。欠失、置換または付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、好ましくは1個~数十個、例えば、1~20個、より好ましくは1個~数個、例えば、1~5個のアミノ酸である。

40

【0026】

本発明に記載される同一性の数値は、特に明示した場合を除き、当業者に公知の同一性検索プログラムを用いて算出される数値であってよいが、塩基配列については、BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)]においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値など、アミノ酸配列については、BLAST2 [Nucleic Acids Res., 25, 3389 (1997); Genome Res., 7, 649 (1997); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/information3.html>]においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値などがあげられる。

【0027】

50

デフォルトのパラメータとしては、G (Cost to open gap) が塩基配列の場合は5、アミノ酸配列の場合は11、-E (Cost to extend gap) が塩基配列の場合は2、アミノ酸配列の場合は1、-q (Penalty for nucleotide mismatch) が-3、-r (reward for nucleotide match) が1、-e (expect value) が10、-W (word size) が塩基配列の場合は11残基、アミノ酸配列の場合は3残基、-y (Dropoff (X) for blast extensions in bits) がblastnの場合は20、blastn以外のプログラムでは7、-X (X dropoff value for gapped alignment in bits) が15および-Z (final X dropoff value for gapped alignment in bits) がblastnの場合は50、blastn以外のプログラムでは25である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/blaststcghelp.html>)。

【0028】

配列番号2で示されるアミノ酸配列の部分配列からなるポリペプチドは、当業者に公知の方法によって作製することができ、例えば、配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードするDNAの一部を欠失させ、これを含む発現ベクターを導入した形質転換体を培養することにより作製することができる。また、こうして作製されるポリペプチドまたはDNAに基づいて、上記と同様の方法により、配列番号2で示されるアミノ酸配列の部分配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを得ることができる。

【0029】

本発明において、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むIgA1重鎖遺伝子によってコードされるポリペプチドとは、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むIgA1重鎖であればいずれのものでもよく、具体的には、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含む、配列番号3で示される塩基配列によってコードされるIgA1重鎖ポリペプチドがあげられる。

【0030】

IgA1のヒンジ領域とは、具体的には文献[Biochemical and Biophysical Research Communication]で示されているIgA1重鎖ポリペプチドの223~240番目に相当する領域等が挙げられる。本発明において、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むIgA1重鎖遺伝子によってコードされるポリペプチドのヒンジ領域とは、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むIgA1重鎖ポリペプチドのヒンジ領域であればいずれのものでもよく、具体的には、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含む、配列番号3で示される塩基配列によってコードされるIgA1重鎖ポリペプチドに共通して含まれる、配列番号1で示されるアミノ酸配列があげられる。

【0031】

O結合型糖鎖とは、タンパク質のセリン(Ser)またはスレオニン(Thr)のアミノ酸残基において、各アミノ酸側鎖に含まれる-OH基を介して糖鎖が結合した構造をいう。O結合型糖鎖の中でも、ポリペプチド上におけるSerまたはThrアミノ酸側鎖の-OH基に、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)が結合したO結合型糖鎖を、ムチン型糖鎖という。O結合型糖鎖の具体例としては、T抗原(TF抗原)、シアリルT抗原、Tn抗原またはシアリルTn抗原などがあげられる(表1)。

【0032】

10

20

30

40

【表 1】

糖鎖抗原名	糖鎖構造
Tn antigen	GalNAc1 α \rightarrow Ser/Thr
Sialyl Tn antigen	NeuNAc α 2 \rightarrow 6GalNAc1 α \rightarrow Ser/Thr
T antigen	Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc1 α \rightarrow Ser/Thr
Sialyl T antigen	NeuNAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc1 α \rightarrow Ser/Thr

(NeuNAc : N-アセチルノイラミン酸)

10

【0033】

本発明において、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖とは、タンパク質のSerまたはThrのアミノ酸残基の-OH基を介して結合したN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) に、ガラクトース (Gal) が結合していないO結合型糖鎖のことをいい、具体的には上記のTn抗原およびシアリルTn抗原があげられる。ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖は、正常O結合型糖鎖の合成経路における中間体であり、通常、正常細胞における糖タンパク質には殆んど存在せず、癌や腎症などある特定の疾患において発現が確認される。

【0034】

以下、本発明において、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を異常糖鎖、異常糖鎖が結合したタンパク質を糖鎖不全型タンパク質および異常糖鎖が結合したIgA1を糖鎖不全型IgA1と記載することがある。

20

O結合型糖鎖が結合するポリペプチドにおけるアミノ酸残基としては、IgA1重鎖ポリペプチドのヒンジ領域のアミノ酸配列中のセリン (Ser) またはスレオニン (Thr) のアミノ酸残基が挙げられる。

【0035】

また、O結合型糖鎖が結合するポリペプチドにおけるアミノ酸残基は、O結合型糖鎖結合コンセンサス配列を、NetOGlyc3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) などの配列検索ソフトを用いて確認することができる。または、O結合型糖鎖を有する糖タンパク質のマススペクトルメトリー (MS) 解析を行うことで、具体的な糖鎖結合部位を特定することができる。

30

【0036】

本発明において、IgA1重鎖ポリペプチド上のO結合型糖鎖が結合するヒンジ領域ポリペプチドにおけるアミノ酸残基としては、IgA1重鎖ポリペプチドのヒンジ領域アミノ酸配列のうち、いずれのSerまたはThr残基にもO結合型糖鎖が結合し得るが、好ましくはヒトIgA1重鎖ポリペプチドのアミノ酸配列において、225番目のスレオニン、228番目のスレオニン、230番目のセリン、232番目のセリン、236番目のスレオニンの中から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基からなる糖鎖結合部位があげられる。

【0037】

IgA1重鎖ポリペプチド1分子あたりの重鎖ヒンジ領域に結合するO結合型糖鎖の数としては、少なくとも1つのSer残基またはThr残基にO結合型糖鎖が結合していればよく、O結合型糖鎖の数は限定されない。

40

本発明の、ガラクトースが結合していないO結合型糖鎖を含むIgA1 (以下、糖鎖不全型IgA1と記載する) を発現した細胞を取得する方法としては、O結合型糖鎖合成プロセスにおいて、ポリペプチド上のSer/Thrに結合したN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) にGalを付加する酵素、該酵素の活性に関与するタンパク質またはuridine 5'-diphosphate-galactose (UDP-galactose) の輸送に関わるタンパク質などの活性を、低下または欠損させた細胞株にIgA1重鎖をコードするDNAとIgA1軽鎖をコードするDNAを導入することにより、糖鎖不全型IgA1発現細胞を作製することができる。また、正常O型糖鎖を含むIgA1を発現する細胞に対して、シアリダーゼおよびガラクトシダーゼ等の糖鎖切断酵素を作用させることに

50

より、ガラクトースの結合していないO結合型糖鎖を有するIgA1発現細胞を作製することも可能である。

【0038】

ポリペプチド上におけるSerまたはThrに結合したGalNAcにGalを付加する酵素の具体例としては、1,3-galactosyl transferase[The Journal of Biological Chemistry,277,178-186(2002)]などがあげられる。また、ポリペプチド上におけるSerまたはThrに結合したGalNAcにGalを付加する酵素の活性に関与するタンパク質としては、該酵素のタンパク質フォールディングに関与するシャペロンであるCosmc[Proceedings of the National Academy of Sciences of theUnitedStates of America, 99, 16613-16618(2002)]などがあげられる。

10

【0039】

IgA腎症の患者由来のIgA1発現細胞は、ポリペプチド上のSer/Thrに結合したGalNAcにGalを付加する酵素、該酵素の活性に関与するタンパク質またはUDP-galactoseの輸送に関わるタンパク質などのをコードするDNAに付加、欠失または置換などが生じることで酵素の活性が低下または欠損していることから、糖鎖不全型IgA1発現細胞として利用することができる。

【0040】

UDP-galactoseの輸送に関わるタンパク質としては、UDP-Galactosetransporterなどがあげられる。UDP-galactose transporterの活性が低下または欠損した細胞株としては、Lec8細胞[Glycobiology.1,307-14(1991)]などがあげられる。

20

本発明において、糖鎖不全型IgA1を発現した細胞としては、ヒト体内に内在的に存在する細胞、ヒト体内に内在的に存在する細胞から樹立された細胞株または遺伝子組換え技術により得られた細胞などがあげられる。好ましくは、上述のような、O結合型糖鎖合成プロセスにおいて、ポリペプチド上のSer/Thrに結合したGalNAcにGalを付加する酵素、該酵素の活性に関与するタンパク質またはUDP-galactoseの輸送に関わるタンパク質などの活性を、低下または欠損した細胞株、同様な性質を有しヒト体内に内在的に存在する細胞などがあげられる。

【0041】

ヒト体内に内在的に存在する細胞としては、O結合型糖鎖合成プロセスにおいて、ポリペプチド上のSer/Thrに結合したGalNAcにGalを付加する酵素、該酵素の活性に関与するタンパク質またはUDP-galactoseの輸送に関わるタンパク質などの活性が、低下または欠損した細胞株が好ましく、具体的にはIgA腎症患者体内あるいは癌患者体内においてIgA1重鎖ポリペプチドが発現している細胞があげられ、例えば、バイオプシーなどで得られた免疫関連細胞あるいは腫瘍細胞のうちでIgA1重鎖ポリペプチドが発現している細胞があげられる。

30

【0042】

遺伝子組換え技術により得られる細胞としては、O結合型糖鎖合成プロセスにおいて、ポリペプチド上のSer/Thrに結合したGalNAcにGalを付加する酵素、該酵素の活性に関与するタンパク質またはUDP-galactoseの輸送に関わるタンパク質などの活性を、低下または欠損させた宿主細胞を作製し、目的のポリペプチドをコードするcDNAを含む発現ベクターを宿主細胞に導入することにより、糖鎖不全型IgA1を発現した細胞があげられる。

40

【0043】

宿主細胞としては、具体的にはUDP-galactose transporterの活性が低下したLec8細胞、または1,3-galactosyl transferaseまたは本酵素活性に関与するCosmcシャペロンタンパク質の異常により、酵素の活性が低下または欠損しているIgA腎症患者由来のIgA1発現細胞などがあげられる。

更に、糖鎖不全型IgA1タンパク質を作製する方法としては、上述のIgA1発現細胞を用いて、糖鎖不全型IgA1タンパク質を発現、精製する方法などがあげられる。

【0044】

糖鎖不全型IgA1タンパク質を取得する方法としては、IgA1タンパク質と他の物質との融

50

合タンパク質として発現させ、精製することで取得することができる。IgA1タンパク質と融合させる物質としては、抗体定常領域、抗体Fc領域、GSTタグ、ヒスチジンタグ（Hisタグともいう）またはMycタグなどのポリペプチドなどがあげられる。該融合タンパク質は、Protein A、ニッケルカラム、特異的抗体カラムなどの、アフィニティーカラムを用いることにより分離精製することができる。

【0045】

上述のようにして得られた糖鎖不全型IgA1細胞または糖鎖不全型IgA1に対して本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片は結合活性を有する。

本発明の抗体または該抗体断片が糖鎖不全型IgA1タンパク質に結合することは、例えば公知の免疫学的検出法、好適には蛍光細胞染色法等を用いて、特定の抗原を発現した細胞と特定抗原に対する抗体の結合性を確認する方法により確認することができる。また、公知の免疫学的検出法 [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック (1987)] などを組み合わせて確認することもできる。

10

【0046】

本発明における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る抗体、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あげることができる。

ハイブリドーマは、例えば上記の糖鎖不全型IgA1を発現した細胞などを抗原として調製し、該抗原を免疫した動物より抗原特異性を有する抗体生産細胞を誘導し、さらに、該抗体生産細胞と骨髄腫細胞とを融合させることにより、調製することができる。該ハイブリドーマを培養するか、あるいは該ハイブリドーマ細胞を動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより抗糖鎖不全型IgA1抗体を取得することができる。

20

【0047】

抗原を免疫する動物としてはハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができるが、マウス、ラット、ハムスター、ラビットなどが好適に用いられる。またこのような動物から抗体産生能を有する細胞を取得し、該細胞に *in vitro* で免疫を施した後に、骨髄腫細胞と融合して作製したハイブリドーマが生産する抗体なども本発明の抗体に包含される。

30

【0048】

モノクローナル抗体とは、単クローンの抗体産生細胞が分泌する抗体であり、ただ一つのエピトープ（抗原決定基ともいう）を認識し、モノクローナル抗体を構成するアミノ酸配列（1次構造）が均一である。

エピトープとは、モノクローナル抗体が認識し、結合する単一のアミノ酸配列、アミノ酸配列からなる立体構造、糖鎖が結合したアミノ酸配列および糖鎖が結合したアミノ酸配列からなる立体構造などがあげられる。本発明のモノクローナル抗体のエピトープとしては、糖鎖不全型IgA1タンパク質の立体構造があげられる。

40

【0049】

本発明のモノクローナル抗体としては、糖鎖不全型IgA1の重鎖ヒンジ領域を認識し、かつ結合するモノクローナル抗体であればいずれの抗体でもよいが、具体的にはモノクローナル抗体KM4137、KM4138、KM4139、KM4140およびKM4144などがあげられる。

より具体的には、ハイブリドーマKM4137により生産されたモノクローナル抗体KM4137、モノクローナル抗体KM4137と競合して糖鎖不全型IgA1の重鎖ヒンジ領域に結合するモノクローナル抗体、およびモノクローナル抗体KM4137が結合する糖鎖不全型IgA1重鎖ヒンジ領域に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体があげられる。

【0050】

本発明のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM4138により生産されたモノクローナル抗体KM4138、モノクローナル抗体KM4138と競合して糖鎖不全型IgA1の重鎖ヒンジ

50

領域に結合するモノクローナル抗体、およびモノクローナル抗体KM4138が結合する糖鎖不全型IgA1重鎖ヒンジ領域に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体もあげられる。

【0051】

本発明のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM4139により生産されたモノクローナル抗体KM4139、モノクローナル抗体KM4139と競合して糖鎖不全型IgA1の重鎖ヒンジ領域に結合するモノクローナル抗体、およびモノクローナル抗体KM4139が結合する糖鎖不全型IgA1重鎖ヒンジ領域に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体もあげられる。

【0052】

また、本発明のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM4140により生産されたモノクローナル抗体KM4140、モノクローナル抗体KM4140と競合して糖鎖不全型IgA1の重鎖ヒンジ領域に結合するモノクローナル抗体、およびモノクローナル抗体KM4140が結合する糖鎖不全型IgA1重鎖ヒンジ領域に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体もあげられる。

【0053】

更に、本発明のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマKM4144により生産されたモノクローナル抗体KM4144、モノクローナル抗体KM4144と競合して糖鎖不全型IgA1の重鎖ヒンジ領域に結合するモノクローナル抗体、およびモノクローナル抗体KM4144が結合する糖鎖不全型IgA1重鎖ヒンジ領域に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体などがあげられる。

【0054】

本発明のモノクローナル抗体と競合反応するモノクローナル抗体としては、具体的には上述のように各種モノクローナル抗体と糖鎖不全型IgA1の重鎖ヒンジ領域に存在するエピトープに対して競合反応を有するモノクローナル抗体があげられる。

モノクローナル抗体と競合反応するとは、本発明のモノクローナル抗体と同一あるいは部分的に同一のエピトープを抗原に有し、該エピトープに結合する抗体をいう。

【0055】

また本発明のモノクローナル抗体が結合するエピトープに結合するモノクローナル抗体としては、具体的には上述のように各種モノクローナル抗体が認識する糖鎖不全型IgA1重鎖ヒンジ領域に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体があげられる。

ハイブリドーマKM4137、KM4140、KM4144は平成21年12月18日付でブダペスト条約に基づき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（305-8566 日本国 茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）にそれぞれ、受託番号がFERM BP-11214、FERM BP-11215、FERM BP-11216として寄託されている。

【0056】

遺伝子組換え抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体または該抗体断片など、遺伝子組換え技術により製造される抗体を包含する。遺伝子組換え抗体において、抗原結合活性を有し、抗原性が低く、血中半減期が延長されたものは、治療薬として好ましい。

ヒト型キメラ抗体は、非ヒト抗体の重鎖可変領域（以下、VHと表記する）および軽鎖可変領域（以下、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）および軽鎖定常領域（以下、CLと表記する）とからなる抗体をいう。

【0057】

本発明のヒト型キメラ抗体は、以下のようにして製造することができる。すなわち、本発明の、糖鎖不全型IgA1を特異的に認識、かつ該重鎖ヒンジ領域に結合するモノクローナル抗体、もしくは糖鎖不全型IgA1を特異的に認識し、かつ該重鎖ヒンジ領域に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入して抗体を発現させて

10

20

30

40

50

作製することができる。

【0058】

ヒト型キメラ抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン（以下、hlgと表記する）に属すればいかなるものでもよいが、hlgGクラスのもの好適であり、さらにhlgGクラスに属するhlgG1、hlgG2、hlgG3、hlgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のCLとしては、hlgに属すればいずれのものでもよく、クラスあるいはクラスのものをを用いることができる。

【0059】

ヒト化抗体は、非ヒト抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列をヒト抗体のVHおよびVLの適切な位置に移植した抗体をいい、ヒト型CDR移植抗体、再構成抗体（reshaped antibody）ともいう。

本発明のヒト化抗体は、本発明の糖鎖不全型IgA1タンパク質を特異的に認識し、かつ該重鎖ヒンジ領域に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから産生される非ヒト抗体の、VHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を、任意のヒト抗体のVHおよびVLのフレームワーク（以下、FRと記す）に移植した抗体可変領域（以下、V領域と記す）をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターに、それぞれ挿入してヒト化抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0060】

ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列は、ヒト抗体由来のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列であれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bankなどのデータベースに登録されているヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列、またはSequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)などに記載の、ヒト抗体のVHおよびVLのFRの各サブグループの共通アミノ酸配列などが用いられる。

【0061】

ヒト化抗体のCHとしては、hlgに属すればいかなるものでもよいが、hlgGクラスのもの好適であり、さらにhlgGクラスに属するhlgG1、hlgG2、hlgG3、hlgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト化抗体のCLとしては、hlgに属すればいずれのものでもよく、クラスあるいはクラスのものをを用いることができる。

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に内在的に存在する抗体をいうが、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なども含まれる。

【0062】

ヒト体内に内在的に存在する抗体は、例えば、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不死化し、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養上清中より該抗体を精製することができる。

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することによりFab、scFvなどの抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。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表面に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、遺伝子工学的的手法により2本の完全なH鎖およびL鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

【0063】

ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物を意味する。具体的には、例えば、マウスES細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ES細胞をマウスの初期胚へ移植後、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マウスを作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方法は、通常ヒト以外の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、培養することで培養上清中にヒト抗体を産生蓄積させること

10

20

30

40

50

ができる。

【0064】

上述の抗体または抗体断片を構成するアミノ酸配列において、1つ以上のアミノ酸が欠失、付加、置換または挿入され、かつ上述の抗体またはその抗体断片と同様な活性を有する抗体またはその抗体断片も、本発明の抗体またはその抗体断片に包含される。

欠失、置換、挿入および/または付加されるアミノ酸の数は1個以上でありその数は特に限定されないが、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数である。例えば、1~数十個、好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個である。

10

【0065】

上記の抗体のアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたとは、次のことを示す。同一配列中の任意、かつ1もしくは複数のアミノ酸配列中において、1または複数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入および/または付加があることを意味する。また、欠失、置換、挿入および/または付加が同時に生じる場合もあり、置換、挿入または付加されるアミノ酸残基は天然型と非天然型いずれの場合もある。天然型アミノ酸残基としては、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリンおよびL-システインなどがあげられる。

20

【0066】

以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の好ましい例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸

30

C群：アスパラギン、グルタミン

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸

E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン

F群：セリン、スレオニン、ホモセリン

G群：フェニルアラニン、チロシン

本抗体のエフェクター活性としては、ADCC活性、CDC活性、抗体依存性貪食活性 (antibody dependent cellular phagocytosis, ADCP)、オプソニン化効果などがあげられ、種々の方法で制御することができる。

40

【0067】

エフェクター活性を制御する方法としては、抗体のFc領域に結合した糖鎖を制御する方法、抗体のFc領域のアミノ酸残基をアミノ酸改変する方法などがあげられる。

抗体のFc領域に結合した糖鎖を制御する方法としては、IgG抗体の297番目の糖鎖を除去することでADCC、CDC活性を低下させる方法 [Molecular Immunology, 32, 1311, (1995), WO 2008/030564]、抗体のFc領域へのガラクトースの結合を低下させてCDC活性を低下させる方法などがあげられる。

【0068】

また、抗体のFc領域に結合した糖鎖を制御する方法としては、IgG抗体のFc領域の297番目のアスパラギンに結合したN結合型糖鎖において、糖鎖が結合している基部のN-アセチ

50

ルグルコサミン (GlcNAc) に、フコースが結合していない糖鎖を含む抗体を生産する方法 (US7,214,775、US6,946,292)、bisecting GlcNAcを結合させた糖鎖を含む抗体を生産させる方法 [Nature Biotechnology, 17, 176, (1999)]、非還元末端に結合したガラクトース (Gal) を結合させた糖鎖を有する抗体を生産させる方法 [Hum.Antibod.Hybridomas, 5, 143-151, (1994)] などの方法をあげることができる。

【0069】

抗体のFc領域のアミノ酸残基をアミノ酸改変する方法としては、抗体のFc領域のアミノ酸改変を行うことでエフェクター活性を制御する方法 (J.B.C., 277, 26733-26740, 2002、US6,737,056、US7,297,775、US2007/0020260、W02005/070963)、および抗体のFc領域の各サブクラス間のドメイン交換を行うことでエフェクター活性を制御する方法 (W02007/011041) などがあげられる。

10

【0070】

本発明の抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、diabody、dsFvなどがあげられる。

本発明の抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、diabody、dsFvおよびCDRを含むペプチドなどがあげられる。

Fabは、IgGをタンパク質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち (H鎖の224番目のアミノ酸残基で切断される)、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0071】

本発明のFabは、本発明の糖鎖不全型IgA1タンパク質を特異的に認識し、かつ該重鎖ヒンジ領域に結合するモノクローナル抗体をタンパク質分解酵素パパインで処理して得ることができる。または、該抗体のFabをコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

20

【0072】

F(ab')₂は、IgGのヒンジ領域の2個のジスルフィド結合の下部を酵素ペプシンで分解して得られた、2つのFab領域がヒンジ部分で結合して構成された、分子量約10万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

本発明のF(ab')₂は、本発明の糖鎖不全型IgA1タンパク質を特異的に認識し、かつ該重鎖ヒンジ領域に結合するモノクローナル抗体をタンパク質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記のFab'をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させ、作製することができる。

30

【0073】

Fab'は、上記F(ab')₂のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明のFab'は、本発明の糖鎖不全型IgA1タンパク質を特異的に認識し、かつ該重鎖ヒンジ領域に結合する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を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

40

【0074】

scFvは、1本のVHと1本のVLとを適当なペプチドリinker (以下、Pと表記する) を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明のscFvは、本発明の糖鎖不全型IgA1タンパク質を特異的に認識し、かつ該重鎖ヒンジ領域に結合するモノクローナル抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるい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あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

50

【0075】

diabodyは、scFvが二量体化した抗体断片で、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。二価の抗原結合活性は、同一であることもできるし、一方を異なる抗原結合活性とすることもできる。

本発明のdiabodyは、本発明の糖鎖不全型IgA1タンパク質を特異的に認識し、かつ該重鎖ヒンジ領域に結合するモノクローナル抗体を取得し、scFvをコードするDNAをPのアミノ酸配列の長さが8残基以下となるように構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるい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あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0076】

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該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法 [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。

本発明のdsFvは、本発明の糖鎖不全型IgA1タンパク質を特異的に認識し、かつ該重鎖ヒンジ領域に結合するモノクローナル抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、dsFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるい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あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0077】

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inkerを介して結合させることができる。

本発明のCDRを含むペプチドは、本発明の糖鎖不全型IgA1タンパク質を特異的に認識し、かつ該重鎖ヒンジ領域に結合するモノクローナル抗体のVHおよびVLのCDRをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるい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あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0078】

また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、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。

本発明には、本発明の糖鎖不全型IgA1タンパク質を特異的に認識し、かつ該重鎖ヒンジ領域に結合するモノクローナル抗体または抗体断片に、薬剤、タンパク質、放射性同位元素などを化学的あるいは遺伝子工学的に結合させた抗体とのコンジュゲートを包含する。

【0079】

本発明のコンジュゲートは、本発明の糖鎖不全型IgA1タンパク質を特異的に認識し、かつ該重鎖ヒンジ領域に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片のH鎖あるいはL鎖のN末端側あるいはC末端側、抗体またはその抗体断片中の適当な置換基あるいは側鎖、さらには抗体またはその抗体断片中の糖鎖などに薬剤、タンパク質、放射性同位元素などを化学的手法 [抗体工学入門、金光修著、地人書館 (1994)] により結合させることにより製造することができる。

【0080】

また、本発明の糖鎖不全型IgA1タンパク質を特異的に認識し、かつ該重鎖ヒンジ領域に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片をコードするDNAと、結合させたいタンパク質をコードするDNAを連結させて発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを、原核生物あるいは真核生物の宿主細胞へ導入するという遺伝子工学的手法によっても製造することができる。

【0081】

薬剤としては、化学療法剤、抗体医薬、免疫賦活剤、高分子の薬剤などがあげられる。

タンパク質としては、サイトカイン、増殖因子、毒素タンパク質などがあげられる。

さらに、抗体または該抗体断片に結合させる薬剤は、プロドラッグの形態でもよい。本発明におけるプロドラッグとは、腫瘍環境に存在する酵素などによって化学的な修飾を受け、癌細胞を傷害する作用を有する物質に変換される薬剤をいう。

【0082】

化学療法剤としては、アルキル化剤、ニトロソウレア剤、代謝拮抗剤、抗癌性抗生物質、植物由来アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモン療法剤、ホルモン拮抗剤、アロマターゼ阻害剤、P糖蛋白阻害剤、白金錯体誘導体、M期阻害剤、キナーゼ阻害剤などのいかなる化学療法剤も包含される。化学療法剤としては、アミフォスチン（エチオール）、シスプラチン、ダカルバジン（DTIC）、ダクチノマイシン、メクロレタミン（ナイトロジェンマスタード）、ストレプトゾシン、シクロフォスファミド、イホスファミド、カルムスチン（BCNU）、ロムスチン（CCNU）、ドキシソルピシン（アドリアマイシン）、ドキシソルピシンリポ（ドキシル）、エピルピシン、ゲムシタピン（ゲムザール）、ダウノルピシン、ダウノルピシンリポ（ダウノゾーム）、プロカルバジン、マイトマイシン、シタラピン、エトポシド、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、フルオロウラシル、ビンブラスチン、ピンクリスチン、プレオマイシン、ダウノマイシン、ペプロマイシン、エストラムスチン、パクリタキセル（タキソール）、ドセタキセル（タキソテア）、アルデスロイキン、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ネダプラチン、クラドリピン、カンプトテシン、CPT-11、10-ヒドロキシ-7-エチル-カンプトテシン（SN38）、フロクスウリジン、フルダラビン、ヒドロキシウレア、イホスファミド、イダルビシン、メスナ、イリノテカン、ノギテカン、ミトキサントロン、トポテカン、ロイプロリド、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、ヒドロキシカルバミド、プリカマイシン、ミトタン、ペガスパラガーゼ、ペントスタチン、ピボプロマン、ストレプトゾシン、タモキシフェン、ゴセレリン、リューブロレニン、フルタミド、テニボシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテパ、ウラシルマスタード、ピノレルピン、クロラムブシル、ハイドロコチゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ビンデシン、ニムスチン、セムスチン、カペシタピン、トムデックス、アザチチジン、UFT、オキサロプラチン、ゲフィチニブ（イレッサ）、イマチニブ（STI571）、エルロチニブ、Flt3阻害剤、vascular endothelial growthfactorreceptor（VEGFR）阻害剤、fibroblastgrowthfactor receptor（FGFR）阻害剤、epidermalgrowth factor receptor（EGFR）阻害剤（イレッサ、タルセバなど）ラディシコール、17-アリルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシン、ラパマイシン、アムサクリン、オール-トランスレチノイン酸、サリドマイド、アナストロゾール、ファドロゾール、レトロゾール、エキセメスタン、金チオマレート、D-ペニシラミン、ブシラミン、アザチオプリン、ミゾリピン、シクロスポリン、ラパマイシン、ヒドロコチゾン、ベキサロテン（ターグレチン）、タモキシフェン、デキサメタゾン、プロゲスチン類、エストロゲン類、アナストロゾール（アリミデックス）、ロイプリン、アスピリン、インドメタシン、セレコキシブ、アザチオプリン、ペニシラミン、金チオマレート、マレイン酸クロルフェニラミン、クロロフェニラミン、クレマシチン、トレチノイン、ベキサロテン、砒素、ボルテゾミブ、アロプリノール、ゲムツズマブ、イブリットマブチウキセタン、131トシツテマブ、タルグレチン、オゾガミン、クラリスロマシン、ロイコボリン、イファスファミド、ケトコナゾール、アミノグルテチミド、スラミン、メトトレキセート、Maytansinoidおよびその誘導体、などがあげられる。

【0083】

化学療法剤と抗体とを結合させる方法としては、グルタールアルデヒドを介して化学療法剤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化学療法剤のアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法等があげられる。

抗体医薬としては、抗体の結合によりアポトーシスが誘導される抗原、腫瘍の病態形成に関わる抗原または免疫機能を調節する抗原、病変部位の血管新生に關与する抗原に対する抗体があげられる。

【0084】

10

20

30

40

50

抗体の結合によりアポトーシスが誘導される抗原としては、Cluster of differentiation (以下、CDと記載する) 19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80 (B7.1)、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85、CD86 (B7.2)、human leukocyte antigen (HLA) -Class II、EGFRなどがあげられる。

【0085】

腫瘍の病態形成に関わる抗原または免疫機能を調節する抗原としては、CD4、CD40、CD40リガンド、B7ファミリー分子(CD80、CD86、CD274、B7-DC、B7-H2、B7-H3、B7-H4)、B7ファミリー分子のリガンド(CD28、CTLA-4、ICOS、PD-1、BTLA)、OX-40、OX-40リガンド、CD137、tumor necrosis factor (TNF) 受容体ファミリー分子(DR4、DR5、TNFR1、TNFR2)、TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor (TRAIL)ファミリー分子、TRAILファミリー分子の受容体ファミリー(TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRAIL-R3、TRAIL-R4)、receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANK)、RANKリガンド、CD25、葉酸受容体4、サイトカイン[interleukin-1 (以下、interleukinをILと記す)、IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、transforming growth factor(TGF)、TNF等]、これらのサイトカインの受容体、ケモカイン(SLC、ELC、I-309、TARC、MDC、CTACK等)、これらのケモカインの受容体があげられる。

10

【0086】

病変部位の血管新生を阻害する抗体の抗原としては、vascular endothelial growth factor (VEGF)、Angiopoietin、fibroblast growth factor (FGF)、EGF、platelet-derived growth factor (PDGF)、insulin-like growth factor (IGF)、erythropoietin (EPO)、TGF、IL-8、Ephrin、SDF-1など、およびこれらの受容体があげられる。

20

免疫賦活剤としては、イムノアジュバントとして知られている天然物でもよく、具体例としては、免疫を亢進する薬剤が、-1,3-グルカン(レンチナン、シゾフィラン)、ガラクトシルセラミド(KRN7000)、菌体粉末(ピシバニール、BCG)、菌体抽出物(クレステン)があげられる。

【0087】

高分子の薬剤としては、ポリエチレングリコール(以下、PEGと表記する)、アルブミン、デキストラン、ポリオキシエチレン、スチレンマレイン酸コポリマー、ポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、ヒドロキシプロピルメタクリルアミドなどがあげられる。これらの高分子薬剤を抗体または抗体断片に結合させることにより、(1)化学的、物理的あるいは生物学的な種々の因子に対する安定性の向上、(2)血中半減期の顕著な延長、(3)免疫原性の消失、抗体産生の抑制、などの効果が期待される[バイオコンジュゲート医薬品、廣川書店(1993)]。例えば、PEGと抗体を結合させる方法としては、PEG化修飾試薬と反応させる方法などがあげられる[バイオコンジュゲート医薬品、廣川書店(1993)]。PEG化修飾試薬としては、リジンの-アミノ基の修飾剤(特開昭61-178926)、アスパラギン酸およびグルタミン酸のカルボキシル基の修飾剤(特開昭56-23587)、アルギニンのグアニジノ基の修飾剤(特開平2-117920)などがあげられる。

30

【0088】

サイトカインまたは増殖因子としては、NK細胞、マクロファージ、好中球などの細胞を亢進するサイトカインまたは増殖因子であればいかなるものでもよいが、例えば、インターフェロン(以下、IFNと記す)- α 、INF- γ 、INF- β 、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、顆粒球刺激因子(G-CSF)、顆粒球・マクロファージ刺激因子(GM-CSF)、マクロファージ刺激因子(M-CSF)などがあげられる。

40

【0089】

毒素タンパク質としては、リシン、ジフテリアトキシン、ONTAKなどがあげられ、毒性を調節するためにタンパク質に変異を導入したタンパク毒素も含まれる。

放射性同位元素としては、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{64}Cu 、 ^{199}Tc 、 ^{77}Lu 、 ^{211}At 、Re186、Re188、In111などがあげられる。放射性同位元素は、クロラミンT法等によって抗体に直接結合させることができる。また、放射性同位元素をキレートする物質を抗体に結合させてもよ

50

い。キレート剤としては、methylbenzyl diethylene- triaminepentaacetic acid (MX-DTP A)などがあげられる。

【0090】

本発明においては、本発明で用いられる抗体と、1つ以上の他の薬剤とを組み合わせることで投与すること、または放射線照射とを組み合わせることもできる。他の薬剤としては、上述の化学療法剤、抗体医薬、免疫賦活剤、サイトカインまたは増殖因子などがあげられる。

放射線照射としては、X線、 γ 線などの光子（電磁波）照射、電子線、陽子線、重粒子線などの粒子線照射などが含まれる。

【0091】

組み合わせる投与方法としては、本発明で用いられる抗体との同時投与でもよいし、また、本発明で用いられる抗体の投与と前後して投与しても構わない。

本発明の検出方法、定量方法、検出試薬、定量試薬または診断薬は、特定の標識体を本発明の抗体に標識して用いる方法があげられる。標識体としては、通常の免疫学的検出または測定法で用いられる標識体があげられ、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼなどの酵素、アクリジニウムエステル、ロフィンなどの発光物質、フルオレシニン・イソシアネート（FITC）、トリメチルローダミン（RITC）などの蛍光物質などがあげられる。

【0092】

以下に、本発明の抗体の製造方法について、具体的に説明する。

1. モノクローナル抗体の製造方法

(1) 抗原の調製

下記に記載の方法により、IgA1重鎖全長またはその部分長をコードするcDNAを含む発現ベクターを、O結合型糖鎖合成プロセスにおいて、ポリペプチド上のSer/Thrに結合したGalINAcにGalを付加する酵素、該酵素の活性に関与する蛋白質またはUDP-galactoseの輸送に関わるタンパク質などの活性が低下または欠損した酵母、昆虫細胞、動物細胞等に導入することにより、抗原となる糖鎖不全型IgA1蛋白質、もしくは、糖鎖不全型IgA1を発現させた細胞を得ることができる。また、糖鎖不全型IgA1を細胞膜上または培養液中に多量に発現している各種ヒト由来培養細胞、ヒト組織などから、糖鎖不全型IgA1を精製して抗原を調製する方法、または糖鎖不全型IgA1の部分配列を有する合成ペプチドを調製し、抗原として用いることもできる。更に、糖鎖付加能のない大腸菌等の原核生物を用いて発現、精製したIgA1蛋白質に、試験管内で糖鎖を付加することで、糖鎖不全型IgA1を得ることができる。

【0093】

また、同様にして、正常なO結合型糖鎖合成プロセスを有する酵母、昆虫細胞、動物細胞等の宿主細胞に、IgA1重鎖全長またはその部分長をコードするcDNAを含む発現ベクターを導入することで、正常なO結合型糖鎖を有するIgA1重鎖を発現させた細胞を取得することができ、該細胞から正常なO結合型糖鎖を有するIgA1重鎖タンパク質を精製することができる。

【0094】

上述のようにして得られた、糖鎖不全型IgA1蛋白質、正常O結合型糖鎖を有するIgA1蛋白質またはそれらの発現細胞は、目的の抗体のスクリーニング、取得された抗体の抗原に対する反応性を確認するために、使用することができる。

本発明で用いられるポリペプチドとしては、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) や Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) などに記載された方法等を用い、例えば以下の方法により、これを該ポリペプチドコードするDNAを宿主細胞中で発現させて、製造することができる。

【0095】

まず、全長ポリペプチドをコードするcDNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流

10

20

30

40

50

に挿入することにより、組換えベクターを作製する。この際もし必要であれば、全長cDNAをもとにしてポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製し、上記全長cDNAの代わりに該DNA断片を使用してもよい。次いで、該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、ポリペプチドを生産する形質転換体を得ることができる。

【0096】

宿主細胞としては、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等、O結合型糖鎖を付加する能力を有し、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれをも用いることができる。

発現ベクターとしては、使用する宿主細胞において自律複製可能又は染色体中への組込が可能で、ポリペプチドをコードするDNAを転写できる位置に適当なプロモーターを含有しているものが用いられる。

10

【0097】

大腸菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合には、本発明において用いられるポリペプチドをコードするDNAを含有してなる組換えベクターは、原核生物中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明において用いられるDNA及び転写終結配列を含むベクターであることが好ましい。該組換えベクターは、さらに、プロモーターを制御する遺伝子を含んでいてもよい。

【0098】

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2(いずれもRoche Diagnostic社製)、pKK233-2(Pharmacia社製)、pSE280(Invitrogen社製)、pGEMEX-1(Promega社製)、pQE-8(QIAGEN社製)、pKYP10(特開昭58-110600)、pKYP200[Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)]、pLSA1[Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescriptII SK(-)(Stratagene社製)、pTrs30[大腸菌JM109/pTrs30(FERM BP-5407)より調製]、pTrs32[大腸菌JM109/pTrs32(FERM BP-5408)より調製]、pGHA2[大腸菌IGHA2(FERMBP-400)より調製、特開昭60-221091]、pGKA2[大腸菌IGKA2(FERM BP-6798)より調製、特開昭60-221091]、pTerm2(US4686191, US4939094, US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400[J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]、pGEX(Pharmacia社製)、pETシステム(Novagen社製)、pME18SF L3等を挙げることができる。

20

【0099】

プロモーターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター(Ptrp)、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター、T7プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーターを挙げることができる。また、Ptrpを2つ直列させたタンデムプロモーター、tacプロモーター、lac T7プロモーター、let Iプロモーター等のように、人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

30

【0100】

また、上記組換えベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガルノ(Shine-Dalgarno)配列と開始コドンとの間を適当な距離(例えば6~18塩基)に調節したプラスミドを用いることが好ましい。本発明において用いられるポリペプチドをコードするDNAの塩基配列においては、宿主内での発現に最適なコドンとなるように塩基を置換することができる。さらに、上記組換えベクターにおける遺伝子の発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

40

【0101】

宿主細胞としては、エシェリヒア属等に属する微生物、例えば、大腸菌XL1-Blue、大腸菌XL2-Blue、大腸菌DH1、大腸菌MC1000、大腸菌KY3276、大腸菌W1485、大腸菌JM109、大腸菌HB101、大腸菌No.49、大腸菌W3110、大腸菌NY49、大腸菌DH5等を挙げることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいず

50

れも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 69, 2110 (1972)]、Gene, 17, 107 (1982) や Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979) に記載の方法等を挙げることができる。

【 0 1 0 2 】

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8 (フナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平3-22979; Cytotechnology, 3, 133, (1990)]、pAS3-3 (特開平2-227075)、pCDM8 [Nature, 329, 840, (1987)]、pcDNA1/Amp (Invitrogen社製)、pcDNA3.1 (Invitrogen社製)、pREP4 (Invitrogen社製)、pAGE103 [J.Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、pAGE210、pME18SFL3、pKANTEX93 [W097/10354]などを挙げることができる。

10

【 0 1 0 3 】

プロモーターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SRプロモーター、モロニーマウス白血病ウイルス (moloneymurine leukemia virus) のプロモーターおよびエンハンサー等を挙げることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【 0 1 0 4 】

宿主細胞としては、糖鎖合成経路のうちポリペプチド上のSer/Thrに結合したN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) にGalを付加する酵素、該酵素の活性に関与するタンパク質またはuridine5'-diphosphate-galactose (UDP-galactose) の輸送に関わるタンパク質などの活性を、低下または欠損させた細胞株であればいかなるものでもよい。具体的には、UDP-galactose transporterが欠損したチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO細胞) であるLec8変異体 [ACSSymp.Ser.128, 214 (1980)]があげられる。

20

【 0 1 0 5 】

更に、糖鎖合成経路に関連する酵素、輸送タンパク質の活性が欠損していない細胞であっても、UDP-galactose transporter (別名UDP-galactose translocator; UGALT) あるいは、core1 synthase, glycoprotein-n-acetylgalactosamine3-beta-galactosyltransferase, (C1GALT1、別名core 1 beta-3-gal-t, t synthase) あるいはC1GALT1-specific chaperone 1 (c1galt1c1、別名core 1beta-3-galactosyltransferase-specific molecular chaperone (COSMC)、C1GALT2) などの酵素、輸送タンパク質の機能を、低下もしくは欠損させた細胞株を用いることができる。

30

【 0 1 0 6 】

糖鎖合成経路に関連する酵素、輸送タンパク質の活性が欠損していない細胞としては、たとえば (Namalwa) 細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスター由来の細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299) 等が挙げられる。

遺伝子機能を低下させる方法としては、アンチセンス法、リボザイム法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96, 1886 (1999)]、相同組換え法 [Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)]、RNA-DNAologonucleotide (RDO) 法、RNA interference (RNAi) 法 [Nature, 391, 806, (1998)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 15502, (1998)、Nature, 395, 854, (1998)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 5049, (1999)、Cell, 95, 1017, (1998)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 1451, (1999)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 13959, (1998)、Nature Cell Biol., 2, 70, (2000)]、レトロウイルスを用いた方法、トランスポゾンを用いた方法 [Nature Genetics, 25, 35, (2000)]等があげられる。

40

【 0 1 0 7 】

ベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン

50

酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法 [Proc.Natl.Acad.Sci.USA,84,7413(1987)]などを挙げることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合タンパク質発現等を行うことができる。真核生物由来の細胞で発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたポリペプチドを得ることができる。

【0108】

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に該ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、ポリペプチドを製造することができる。該形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル -D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

【0109】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519(1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501(1952)]、ダルベッコ改変MEM培地 [Virology, 8, 396(1959)]、199培地 [Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 73, 1(1950)]又はこれら培地にFCS等を添加した培地等を用いることができる。培養は、通常pH6~8、30~40℃、5% CO₂存在下の条件下で1~7日間行う。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0110】

上記のとおり、本発明において用いられるポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換えベクターを保有する微生物、動物細胞等由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養して該ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より採取することにより、本発明において用いられるポリペプチドを製造することができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合タンパク質発現等を行うことができる。

【0111】

ポリペプチドの生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、及び宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるポリペプチドの構造を変えることにより、適切な方法を選択することができる。

ポリペプチドが宿主細胞内又は宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [J. Biol. Chem., 264, 17619(1989)]、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227(1989)、Genes Develop., 4, 1288(1990)]、又は特開平05-336963、W094/23021等に記載の方法を用いることで、該遺伝子産物を宿主細胞外に分泌させることができる。

【0112】

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

ポリペプチドは、例えば、以下のようにして単離・精製することができる。

ポリペプチドが細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後に細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE

10

20

30

40

50

) - セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学社製) 等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Pharmacia社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独又は組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

【0113】

また、ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として該ポリペプチドの不溶体を回収する。回収した該ポリペプチドの不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈又は透析することにより、該ポリペプチドを正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法によりポリペプチドの精製標品を得ることができる。

10

【0114】

また、本発明において用いられるポリペプチドは、Fmoc法 (フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法 (t-ブチルオキシカルボニル法) 等の化学合成法によっても製造することができる。また、Advanced ChemTech社、パーキン・エルマー社、Pharmacia社、Protein Technology Instrument社、Synthecell-Vega社、PerSeptive社、島津製作所等のペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

【0115】

(2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

3~20週令のマウス、ラットまたはハムスターに上記のように調製した抗原を免疫して、その動物の脾臓、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞を採取する。また、免疫原性が低く上記の動物で十分な抗体価の上昇が認められない場合には、CD27ノックアウト動物を被免疫動物として用いる方法もある。

20

【0116】

免疫は、動物の皮下あるいは静脈内あるいは腹腔内に、適当なアジュバント [例えば、フロインドの完全アジュバント (Complete Freund's Adjuvant) や水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなど] とともに抗原を投与することにより行う。抗原が部分ペプチドである場合には、BSA (ウシ血清アルブミン) やKLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) などのキャリアタンパク質とコンジュゲートを作製し、これを免疫原として用いる。

30

【0117】

抗原の投与は、1回目の投与の後1~2週間おきに5~10回行う。各投与後3~7日目に眼底静脈叢より採血し、その血清が抗原と反応することを酵素免疫測定法 [Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988] などで調べる。免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示したマウス、ラットまたはハムスターを脾臓細胞の供給源として提供する。

【0118】

脾臓細胞と骨髄腫細胞の融合に供するにあたって、抗原物質の最終投与後3~7日目に、免疫したマウス、ラットまたはハムスターより脾臓を摘出し、脾臓細胞を採取する。脾臓をMEM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 (1200rpm、5分間) した後、上清を捨て、トリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH7.65) で1~2分間処理し赤血球を除去し、MEM培地で3回洗浄して融合用脾臓細胞として提供する。

40

【0119】

(3) 骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞を使用する。たとえば、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) [Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1(1978)]、P3-NS1/1-Ag41(NS-1) [European J. Immunology, 6, 511(1976)]、SP2/O-Ag14(SP-2) [Nature, 276, 269(1978)]、P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunology, 123, 1548(1979)]、P3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495(1975)] などが用いられる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地 [RPMI-1640培地にグルタミン

50

(1.5 mM)、2-メルカプトエタノール ($5 \times 10^{-5} M$)、ジェンタマイシン ($10 \mu g/mL$) および牛胎児血清 (FCS) を加えた培地 (以下、正常培地という。) に、さらに 8-アザグアニン ($15 \mu g/mL$) を加えた培地で継代するが、細胞融合の 3~4 日前に正常培地に継代し、融合当日 2×10^7 個以上の細胞数を確保する。

【0120】

(4) 細胞融合

前述した抗体産生細胞と骨髓腫細胞を MEM 培地または PBS (リン酸二ナトリウム 1.83 g、リン酸一カリウム 0.21 g、食塩 7.65 g、蒸留水 1 リットル、pH 7.2) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞 : 骨髓腫細胞 = 5~10:1 になるよう混合し、遠心分離 (1200rpm、5 分間) した後、上清を捨て、沈澱した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37 で、ポリエチレングライコール-1000 (PEG-1000) 2 g、MEM 2mL およびジメチルスルホキシド 0.7 mL の混液 0.2~1 mL/ 10^8 抗体産生細胞を加え、1~2 分間毎に MEM 培地 1~2 mL を数回加えた後、MEM 培地を加えて全量が 50 mL になるようにする。遠心分離 (900 rpm、5 分間) 後、上清を捨て、ゆるやかに細胞をほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかに細胞を HAT 培地 [正常培地にヒポキサンチン ($10^{-4} mol/L$)、チミジン ($1.5 \times 10^{-5} mol/L$) およびアミノプテリン ($4 \times 10^{-7} mol/L$) を加えた培地] 100mL 中に懸濁する。この懸濁液を 96 ウェル培養用プレートに 100 μL /ウェルずつ分注し、5% CO_2 インキュベーター中、37 で 7~14 日間培養する。

10

【0121】

培養後、培養上清の一部をとり後で述べるバインディングアッセイなどにより、本発明において用いられるポリペプチドを含む抗原に反応し、ポリペプチドを含まない抗原に反応しないものを選択する。

20

また、ついで、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モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

【0122】

(5) モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理 [2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン (Pristane) 0.5 mL を腹腔内投与し、2 週間飼育する] した 8~10 週令のマウスまたはヌードマウスに、(4) で得られた抗 CD27 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞 $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ 細胞/匹を腹腔内注射する。10~21 日でハイブリドーマは腹水癌化する。このマウスから腹水を採取し、遠心分離 (3,000rpm、5 分間) して固形分を除去後、40~50 % 硫酸アンモニウムで塩析した後、カプリル酸沈殿法、DEAE-セファロースカラム、プロテイン A-カラムあるいはゲル濾過カラムによる精製を行ない、IgG あるいは、IgM 画分を集め、精製モノクローナル抗体とする。

30

【0123】

抗体のサブクラスの決定は、サブクラスタイピングキットを用いて酵素免疫測定法により行う。蛋白量の定量は、ローリー法および 280 nm での吸光度より算出する。

(6) バインディングアッセイ

抗原としては、本項 (1) に記載の方法により、本発明において用いられる CD27 ポリペプチドをコードする cDNA を含む発現ベクターを大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等に導入して得た遺伝子導入細胞やリコンビナントタンパク質、あるいはヒト組織から得た精製ポリペプチドや部分ペプチドを用いる。抗原が部分ペプチドである場合には、BSA (ウシ血清アルブミン) や KLH (Keyhole Limpet hemocyanin) などのキャリアタンパク質とコンジュゲートを作製して、これを用いる。

40

【0124】

これら抗原を 96 ウェルプレートに分注し固相化した後、第 1 抗体として、被免疫動物血清、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清もしくは精製抗体を分注して反応させる。PBS または PBS-0.05% Tween で、よく洗浄した後、第 2 抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗イムノグロブリン抗体を分注

50

して反応させる。PBS-Tweenでよく洗浄した後、第2抗体の標識物質に応じた反応を行う。

【0125】

ガラクトースが結合していない結合型糖鎖を含むCD27を認識し、かつ該重鎖ヒンジ領域に結合するモノクローナル抗体と競合する抗体は、上述のバインディングアッセイ系に、被検抗体を添加して反応させることで取得できる。すなわち、被検抗体を加えた時にモノクローナル抗体の結合が阻害される抗体をスクリーニングすることにより、糖鎖不全型IgA1の重鎖ヒンジ領域への結合について、取得したモノクローナル抗体と競合するモノクローナル抗体を取得することができる。

【0126】

また、糖鎖不全型IgA1を認識し、かつ該重鎖ヒンジ領域に結合するモノクローナル抗体が認識するエピトープに結合する抗体は、上述のバインディングアッセイ系で取得された抗体のエピトープを同定し、同定したエピトープの、部分的な糖鎖結合ペプチド、またはエピトープの立体構造に擬態させた糖鎖結合ペプチド等を作製し、免疫することで、取得することができる。

【0127】

2. 遺伝子組換え抗体の作製

遺伝子組換え抗体の作製例として、以下にヒト型キメラ抗体およびヒト化抗体の作製方法を示す。

(1) 遺伝子組換え抗体発現用ベクターの構築

遺伝子組換え抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAが組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAをそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

【0128】

ヒト抗体のC領域は任意のヒト抗体のCHおよびCLを用いることができる。例えば、ヒト抗体の 1 サブクラスのCHおよび クラスのCLなどがあげられる。ヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAとしてはエキソンとイントロンからなる染色体DNAを用いることも、cDNAを用いることもできるが、cDNAを用いるのが好ましい。動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [Cytotechnol., 3, 133 (1990)]、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [Gene, 27, 223 (1984)]、pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527 (1981)]、pSG1bd2-4 [Cytotechnol., 4, 173 (1990)]、pSE1UK1Sed 1-3 [Cytotechnol., 13, 79 (1993)]などがあげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーター [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、モロニー Maus 白血病ウイルスのLTR [Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987)]、免疫グロブリンH鎖のプロモーター [Cell, 41, 479 (1985)]とエンハンサー [Cell, 33, 717 (1983)]などがあげられる。

【0129】

遺伝子組換え抗体発現用ベクターは、抗体H鎖およびL鎖が別々のベクター上に存在するタイプ、あるいは同一のベクター上に存在するタイプ(タンデム型)のどちらでも用いることができるが、遺伝子組換え抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体H鎖およびL鎖の発現量のバランスが均衡するなどの点からタンデム型の遺伝子組換え抗体発現用ベクターの方が好ましい [J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)]。タンデム型の遺伝子組換え抗体発現用ベクターとしては、pKANTEX93 [W097/10354]、pEE18 [Hybridoma, 17, 559 (1998)]などがあげられる。

【0130】

(2) ヒト以外の動物由来の抗体のV領域をコードするcDNAの取得およびアミノ酸配列の解析

非ヒト抗体のVH及びVLをコードするcDNAは以下の様にして取得することができる。

非ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成し

10

20

30

40

50

たcDNAをファージ或いはプラスミドなどのベクターにクローニングしてcDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーより、マウス抗体のC領域部分或いはV領域部分をコードするDNAをプローブとして用い、VHまたはVLをコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的とするマウス抗体のVHまたはVLの全塩基配列をそれぞれ決定し、塩基配列よりVHまたはVLの全アミノ酸配列をそれぞれ推定する。

【0131】

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビットなどのハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ハイブリドーマ細胞から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン - トリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymol., 154, 3(1987)] 等、またキットとしてはRNAeasykit (QIAGEN社製) 等が挙げられる。全RNAからmRNAを調製する方法としては、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition (ColdSpringHarbor Laboratory Press, 1989)] 等、またキットとしてはOligoTM-dT30<Super>mRNAPurificationKit (Takara社製) 等があげられる。ハイブリドーマ細胞からmRNAを調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社製)、QuickPrepmRNA Purification Kit (Pharmacia社製) 等があげられる。

cDNAの合成及びcDNAライブラリー作製法としては、常法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition (ColdSpringHarbor Laboratory Press, 1989); Current Protocols in Molecular Biology], Supplement 1-34]、或いは市販のキット、例えば、SuperScriptTM Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (Invitrogen社製) や ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene社製) を用いる方法等があげられる。

【0132】

cDNAライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターは、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAPExpress [Strategies, 5, 58(1992)]、pBluescript IISK (+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494(1989)]、ZAP II (Stratagene社製)、gt10、gt11 [DNA Cloning: A Practical Approach, 1, 49(1985)]、Lambda BlueMid (Clontech社製)、ExCell、pT7T318U (Pharmacia社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)] 及び pUC18 [Gene, 33, 103(1985)] 等が用いられる。

【0133】

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌としては該cDNAライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [Strategies, 5, 81 (1992)]、C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、K802 [J. Mol. Biol., 16, 118(1966)] 及び JM105 [Gene, 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

【0134】

cDNAライブラリーからの非ヒト抗体のVHまたはVLをコードするcDNAクローンの選択法としては、アイソトープ或いは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはプラーク・ハイブリダイゼーション法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)] により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNAから合成したcDNA或いはcDNAライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction [以下、PCR法と表記する; Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34] によりVHまたはVLをコードするcDNAを調製することもできる。

【0135】

上記方法により選択されたcDNAを、適当な制限酵素等で切断後、pBluescript SK(-) (S

10

20

30

40

50

tratagene社製)等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー(Sanger, F.)らのジデオキシ法[Proc.Natl.Acad.Sci.USA,74,5463(1977)]等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、A.L.F.DNAシーケンサー(Pharmacia社製)等を用いて解析することで該cDNAの塩基配列を決定することができる。

【0136】

決定した塩基配列からVH及びVLの全アミノ酸配列をそれぞれ推定し、既知の抗体のVH及びVLの全アミノ酸配列[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]と比較することにより、取得したcDNAが分泌シグナル配列を含む抗体のVH及びVLの完全なアミノ酸配列をコードしているかをそれぞれ確認することができる。分泌シグナル配列を含む抗体のVH及びVLの完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のVH及びVLの全アミノ酸配列[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]と比較することにより、分泌シグナル配列の長さ及びN末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、VH及びVLの各CDRのアミノ酸配列についても、既知の抗体のVH及びVLのアミノ酸配列[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]と比較することによって見出すことができる。

【0137】

更にVH及びVLの完全なアミノ酸配列を用いて任意のデータベース、例えば、SWISS-PROTやPIR-Protein等に対してBLAST法[J.Mol.Biol.,215,403(1990)]等の配列の相同性検索を行い、用いるアミノ酸配列が新規なものであるかどうかを確認することができる。

(3) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

本項2の(1)に記載の遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子の5'上流に、それぞれ非ヒト抗体のVHまたはVLをコードするcDNAをそれぞれクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、非ヒト抗体のVHまたはVLをコードするcDNAの3'末端側と、ヒト抗体のCHまたはCLの5'末端側とを連結するために、連結部分の塩基配列が適切なアミノ酸をコードし、かつ適当な制限酵素認識配列になるように設計した、VHおよびVLのcDNAを作製する。作製されたVHおよびVLのcDNAを、それぞれを本項2の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子の5'上流にそれらが適切な形で発現する様にそれぞれクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。また、非ヒト抗体VHまたはVLをコードするcDNAを、適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成DNAを用いてPCR法によりそれぞれ増幅し、それぞれを本項2の(1)に記載の遺伝子組換え抗体発現用ベクターにクローニングすることもできる。

【0138】

(4) ヒト化抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト化抗体のVHまたはVLをコードするcDNAは、以下の様にして構築することができる。まず、非ヒト抗体のVHまたはVLのCDRのアミノ酸配列を移植するヒト抗体のVHまたはVLのフレームワーク領域(以下、FRと表記する)のアミノ酸配列をそれぞれ選択する。選択するFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いずれのものでも良い。例えば、Protein Data Bank等のデータベースに登録されているヒト抗体のFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のFRの各サブグループの共通アミノ酸配列[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]等があげられる。抗体の結合活性の低下を抑えるため、元の抗体のVHまたはVLのFRのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性(少なくとも60%以上)のFRのアミノ酸配列を選択する。次に、選択したヒト抗体のVHまたはVLのFRのアミノ酸配列に、もとの抗体のCDRのアミノ酸配列をそれぞれ移植し、ヒト化抗体のVHまたはVLのアミノ酸配列をそれぞれ設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]を考慮してDNA配列に変換し、ヒト化抗体のVHまたはVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列をそれぞれ設計する。設計したDNA配列に基づき、100塩基前後の長さからなる数本の合成DNAを合成し、

それらを用いてPCR法を行う。この場合、PCRでの反応効率及び合成可能なDNAの長さから、H鎖、L鎖とも6本の合成DNAを設計することが好ましい。

【0139】

また、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項2の(1)で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にヒト化抗体のVHまたはVLをコードするcDNAをクローニングすることができる。PCR反応後、増幅産物をpBluescript SK(-) (Stratagene社製)等のプラスミドにそれぞれクローニングし、本項2の(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト化抗体のVHまたはVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するプラスミドを取得する。

【0140】

(5) ヒト化抗体のV領域のアミノ酸配列の改変

ヒト化抗体は、非ヒト抗体のVH及びVLのCDRのみをヒト抗体のVH及びVLのFRに移植しただけでは、その抗原結合活性は元の非ヒト抗体に比べて低下してしまうことが知られている[BIO/TECHNOLOGY,9,266(1991)]。この原因としては、元の非ヒト抗体のVH及びVLでは、CDRだけでなく、FR内のアミノ酸残基が直接的或いは間接的に抗原結合活性に関与しているため、ヒト化により非ヒト抗体のFRのアミノ酸残基が、ヒト抗体のFRのアミノ酸残基に置換されると、結抗原合活性が低下してしまうと考えられている。この問題を解決するため、ヒト化抗体では、ヒト抗体のVH及びVLのFRのアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基、CDRのアミノ酸残基と相互作用するアミノ酸残基、および抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらのアミノ酸残基を元の非ヒト抗体のアミノ酸残基に置換することにより、低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている[BIO/TECHNOLOGY,9,266(1991)]。ヒト化抗体の作製においては、それら抗原結合活性に関わるFRのアミノ酸残基を如何に効率よく同定するために、X線結晶解析[J.Mol.Biol., 112, 535(1977)]或いはコンピューターモデリング[ProteinEngineering,7,1501(1994)]等による抗体の立体構造の構築及び解析が行われている。これら抗体の立体構造の情報は、ヒト化抗体の作製に多くの有益な情報をもたらして来たが、その一方、あらゆる抗体に適応可能なヒト化抗体の作製法は未だ確立されておらず、現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討する等の種々の試行錯誤が必要である。

【0141】

ヒト抗体のVH及びVLのFRのアミノ酸残基は、改変用合成DNAを用いて本項2の(4)に記載のPCR法を行うことにより、改変させることができる。PCR後の増幅産物について本項2の(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

(6) ヒト化抗体発現ベクターの構築

本項2の(1)に記載の遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子の上流に、構築した遺伝子組換え抗体のVHまたはVLをコードするcDNAをそれぞれクローニングし、ヒト化抗体発現ベクターを構築することができる。

【0142】

例えば、本項2の(4)及び(5)でヒト化抗体のVHまたはVLを構築する際に用いる合成DNAのうち、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項2の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現するようにそれぞれクローニングすることができる。

【0143】

(7) 遺伝子組換え抗体の一過性発現

作製した多種類のヒト化抗体の抗原結合活性を効率的に評価するために、本項2の(3)及び(6)に記載の遺伝子組換え抗体発現ベクター、或いはそれらを改変した発現ベクターを用いて遺伝子組換え抗体の一過性発現を行うことができる。発現ベクターを導入する宿主細胞としては、遺伝子組換え抗体を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、その発現量の高さから、COS-7細胞(ATCC CRL1651)が一般に

10

20

30

40

50

用いられる [Methods in Nucleic Acids Res.,CRC press,283(1991)]。COS-7細胞への発現ベクターの導入法としては、DEAE-デキストラン法 [Methods in Nucleic Acids Res.,CRC press,283(1991)]、リポフェクション法 [Proc.Natl.Acad.Sci.USA,84,7413(1987)]等があげられる。

【0144】

発現ベクターの導入後、培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量及び抗原結合活性は酵素免疫抗体法 [以下、ELISA法と表記する; Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック (1987)] 等により測定できる。

【0145】

(8) 遺伝子組換え抗体の安定発現

本項2の(3)及び(6)に記載の遺伝子組換え抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することにより遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株を得ることができる。

宿主細胞への発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法 [特開平2-257891、Cytotechnology,3,133(1990)]等があげられる。

【0146】

遺伝子組換え抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、遺伝子組換え抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウスSP2/0-Ag14細胞 (ATCC CRL1581)、マウスP3X63-Ag8.653細胞 (ATCC CRL1580)、2種類のチャニーズハムスター卵巣細胞であるCHO/dhfr-細胞 (ATCC CRL9096) 及びCHO/DG44細胞 [Somatic Cell and Molecular Genetics, 12,555(1986)]、レクチン耐性を獲得したLec13細胞 [Somatic Cell and Molecular Genetics, 12,55(1986)]、1,6-フコース転移酵素遺伝子が欠損したCHO細胞 (WO05/35586、WO02/31140)、ラットYB2/3HL.P2.G11.16 Ag.20細胞 (ATCC CRL1662) などがあげられる。

【0147】

上記宿主細胞の他、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素などのタンパク質、N-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素などのタンパク質または細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与するタンパク質などの活性が低下または欠失した宿主細胞、好ましくはWO05/35586、WO02/31140等に記載の1,6-フコース転移酵素遺伝子が欠損したCHO細胞などを用いることもできる。

【0148】

発現ベクターの導入後、遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、G418硫酸塩 (以下、G418と表記する: SIGMA社製) 等の薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640培地 (Invitrogen社製)、GIT培地 (日本製薬社製)、EX-CELL301培地 (JRH社製)、IMDM培地 (Invitrogen社製)、Hybridoma-SFM培地 (Invitrogen社製)、またはこれら培地に牛胎児血清 (以下、FCSと表記する) 等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中に遺伝子組換え抗体を発現蓄積させることができる。培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量及び抗原結合活性はELISA法等により測定できる。また、形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、DHFR増幅系等を利用して遺伝子組換え抗体の発現量を上昇させることができる。

【0149】

遺伝子組換え抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテインAカラムを用いて精製することができる [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]。また、その他に通常、タンパク質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過等を組み合わせて行い

10

20

30

40

50

、精製することができる。精製した遺伝子組換え抗体のH鎖、L鎖或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動〔以下、SDS-PAGEと表記する：Nature, 227,680(1970)〕やウエスタンブロッティング法〔Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996)、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)〕等で測定することができる。

3．本発明の抗体または抗体断片の活性評価

精製した本発明の抗体または抗体断片の反応特異性は、下記のようにして評価することができる。

【0150】

正常型糖鎖を発現する細胞、およびO結合型糖鎖合成プロセスにおいて、ポリペプチド上のSer/Thrに結合したGalNAcにGalを付加する酵素、該酵素の活性に関与するタンパク質またはuridine 5'-diphosphate-galactose (UDP-galactose)の輸送に関わるタンパク質などの活性が、低下または欠損した細胞株を宿主として、IgA1重鎖をコードする塩基配列(3)を発現させたIgA1発現細胞をそれぞれ作製することができる。このようにして、正常O結合型糖鎖を有するIgA1を発現した細胞、糖鎖不全型IgA1を発現した細胞を作製し、それぞれのIgA1を発現する細胞株と精製抗体との反応性を、ELISA法および蛍光抗体法〔Cancer Immunol. Immunother., 36,373(1993)〕などで測定することができる。

【0151】

また、膜型IgA1の細胞外ドメインを融合タンパク質などの可溶化体として上述の宿主細胞にそれぞれ発現させ、適切な条件下で精製することで、立体構造を保持したIgA1可溶型タンパク質をそれぞれ調製することができる。融合タンパク質としては、IgA1タンパク質を、抗体定常領域(Fcともいう)、GSTタグ、ヒスチジンタグ(Hisタグともいう)またはMycタグなどの別のポリペプチドと融合したものがあげられる。該融合タンパク質は、Protein A、ニッケルカラム、特異的抗体カラムなどの、アフィニティーカラムを用いることにより分離精製することができる。これら精製CD27可溶型タンパク質と精製抗体との反応性を、表面プラズモン共鳴(SPR)を利用したBIAcore™、ELISA法や免疫沈降法等により測定することもできる〔Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996)、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)〕。

4．本発明の糖鎖不全型IgA1を特異的に認識し、かつ該重鎖ヒンジ領域に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片を用いた疾患の診断方法

本発明の抗体または該抗体断片を用いて糖鎖不全型IgA1または該ポリペプチドが発現、蓄積した細胞を検出または定量することにより、糖鎖不全型IgA1に関連する疾患を診断することができる。

【0152】

糖鎖不全型IgA1蛋白質、あるいは、糖鎖不全型IgA1発現細胞が関与する疾患としては、生体内において糖鎖不全型IgA1ポリペプチドを含む蛋白質や、糖鎖不全型IgA1ポリペプチドが発現している細胞が見出される疾患であればいかなるものも包含する。好ましくは、糖鎖不全型IgA1蛋白質、あるいは、糖鎖不全型IgA1発現細胞が関与する疾患の患者の該ポリペプチドの発現量が健常者と比較した場合において、増加している疾患である。具体的には自己免疫疾患あるいは癌があげられる。自己免疫疾患としては、IgA腎症を主とした慢性糸球体腎炎、全身性エリテマトーデス、ヘノッホ・シェンライン紫斑病などがあげられる。また、癌としては、形質細胞(プラズマ細胞)由来の癌、具体的には、形質細胞腫、IgA型骨髄腫マントル細胞リンパ腫、慢性リンパ性白血病、小リンパ性白血病、パーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、モルトリンパ腫、びまん性大細胞リンパ腫、形質細胞腫、などがあげられる。

【0153】

本発明において糖鎖不全型IgA1ポリペプチドを検出または測定する対象となる生体試料としては、組織細胞、血液、血漿、血清、涙液、尿、糞便、組織液、培養液など、該ポリ

10

20

30

40

50

ペプチドを含む可能性のあるものであれば特に限定されない。

糖鎖不全型IgA1が関連する疾患のうち、例えばIgA腎症の診断は以下のようにして行うことができる。

【0154】

複数の健常者の生体から採取した生体試料について、本発明の抗体または該抗体断片、またはこれらの誘導体を用い、下記の免疫学的手法を用いて、糖鎖不全型IgA1ポリペプチドの検出または測定を行い、健常者の生体試料中の該ポリペプチドの発現量を確認する。被験者の生体試料中についても同様に該ポリペプチドの発現量を調べ、その発現量を健常者の発現量と比較する。被験者の該ポリペプチドの発現量が健常者と比較して増加している場合には、IgA腎症である、あるいは将来IgA腎症を発症する可能性が高いと診断することができる。

10

【0155】

糖鎖不全型IgA1が関連する疾患のうち、例えば癌の診断は以下のようにして行うことができる。

複数の健常者の生体から採取した生体試料について、本発明の抗体または該抗体断片、またはこれらの誘導体を用い、下記の免疫学的手法を用いて、糖鎖不全型IgA1の検出または測定を行い、健常者の生体試料中の該ポリペプチドの発現量を確認する。被験者の生体試料中についても同様に該ポリペプチドの発現量を調べ、その発現量を健常者の発現量と比較する。被験者の該ポリペプチドの発現量が健常者と比較して増加している場合には、癌が陽性であると診断することができる。

20

【0156】

本発明の抗体または該抗体断片、またはこれらの誘導体を含有する診断薬は、目的の診断方法に応じて、抗原抗体反応を行うための試薬、該反応の検出用試薬を含んでもよい。抗原抗体反応を行うための試薬としては、緩衝剤、塩などがあげられる。検出用試薬としては、抗体もしくは該抗体断片、またはこれらの誘導体、またはこれらの誘導体を認識する標識された二次抗体、標識物の基質など、通常免疫学的検出または測定法に用いられる試薬があげられる。

【0157】

本発明において糖鎖不全型IgA1の量を検出または測定する方法としては、任意の公知の方法があげられる。例えば、免疫学的検出または測定方法などがあげられる。

30

免疫学的検出または測定方法とは、標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体量または抗原量を検出または測定する方法である。免疫学的検出または測定方法としては、放射性物質標識免疫抗体法(RIA)、酵素免疫測定法(EIAまたはELISA)、蛍光免疫測定法(FIA)、発光免疫測定法(luminescent immunoassay)、ウエスタンブロット法および物理化学的手法(TIA、LAPIA、PCIA)などがあげられる。

【0158】

放射性物質標識免疫抗体法(RIA)としては、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、本発明の抗体または該抗体断片を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する方法があげられる。

40

酵素免疫測定法(EIAまたはELISA)としては、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、本発明の抗体または該抗体断片を反応させ、さらに標識を施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、発色色素を吸光度計で測定する方法があげられ、例えばサンドイッチELISA法などが用いられる。酵素免疫測定法で用いる標識体としては、前述のとおり、任意の公知(石川榮次ら編、酵素免疫測定法、医学書院)の酵素標識を用いることができる。例えば、アルカリフォスファターゼ標識、ペルオキシダーゼ標識、ルシフェラーゼ標識、ビオチン標識などを用いることができる。

【0159】

サンドイッチELISA法は、固相に抗体を結合させた後、検出または測定したい抗原をトラップさせ、トラップされた抗原に第2の抗体を反応させる方法である。該ELISA法では

50

、検出または測定したい抗原を認識する抗体または抗体断片であって、抗原認識部位の異なる2種類の抗体を準備し、そのうち、一方の抗体または抗体断片を予めプレート（例えば、96ウェルプレート）に吸着させ、第2の抗体または抗体断片をFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素、ビオチンなどで標識しておく。上記の抗体が吸着したプレートに、生体内から分離された、細胞またはその破砕液、組織またはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などを反応させた後、標識したモノクローナル抗体または抗体断片を反応させ、標識物質に応じた検出反応を行う。該方法により、被験サンプル中の抗原濃度を測定する場合には、濃度既知の抗原を段階的に希釈して作製した検量線より、被験サンプル中の抗原濃度を算出することができる。サンドイッチELISA法に用いる抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれを用いてもよく、Fab、Fab'、F(ab')₂などの抗体フラグメントを用いてもよい。サンドイッチELISA法で用いる2種類の抗体の組み合わせとしては、異なるエピトープを認識するモノクローナル抗体または抗体断片の組み合わせでもよいし、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体または抗体断片の組み合わせでもよい。

10

20

30

40

50

【0160】

蛍光免疫測定法（FIA）としては、文献 [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996) ; 単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック (1987)] などに記載された方法があげられる。蛍光免疫測定法で用いる標識体としては、前述のとおり、任意の公知（川生明著、蛍光抗体法、ソフトサイエンス社）の蛍光標識を用いることができる。例えば、FITC標識、RITC標識などを用いることができる。

【0161】

発光免疫測定法（luminescent immunoassay）としては、[Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック (1987)] などに記載された方法を用いて行うことができる。発光免疫測定法で用いる標識体としては、前述のとおり、任意の公知 [今井一洋編、生物発光と化学発光、廣川書店；臨床検査42 (1998)] の発光体標識があげられる。例えば、アクリジニウムエステル標識、ロフィン標識などを用いることができる。

【0162】

ウエスタンブロット法は、抗原または抗原を発現した細胞などをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 [Antibodies-A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)] で分画した後、該ゲルをPVDF膜またはニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に抗原を認識する抗体または抗体断片を反応させ、さらにFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素標識、ビオチン標識などを施した抗マウスIgG抗体または結合断片を反応させた後、該標識を可視化することによって確認する方法である。ウエスタンブロット法の一例を以下に示す。

【0163】

配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現している細胞や組織を溶解し、還元条件下でレーンあたりのタンパク量として0.1~30 μgをSDS-PAGE法により泳動する。泳動されたタンパク質をPVDF膜にトランスファーし1%BSAを含むPBS（以下、BSA-PBSと表記する）に室温で30分間反応させブロッキング操作を行う。ここで本発明のモノクローナル抗体を反応させ、0.05%のTween-20を含むPBS（以下、Tween-PBSと表記する）で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗マウスIgGを室温で2時間反応させる。Tween-PBSで洗浄し、ECLTM Western blotting detection reagents (Amersham社製)などを用いてモノクローナル抗体が結合したバンドを検出することにより、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを検出することができる。ウエスタンブロッティングでの検出に用いられる抗体としては、天然型の立体構造を保持していないポリペプチドに結合できる抗体が用いられる。

【0164】

物理化学的手法とは、具体的には、本発明の抗体または該抗体断片を用いて、抗原であ

るガラクトースを欠損したO型糖鎖を結合するCD27と本発明の抗体または該抗体断片とを結合させることにより凝集体を形成させて、この凝集体を検出することにより行う。この他に物理化学的手法としては、毛細管法、一次元免疫拡散法、免疫比濁法あるいはラテックス免疫比濁法等があげられる〔臨床検査法提要、金原出版、499(1998)〕。

【0165】

例えば、ラテックス免疫比濁法では、抗体または抗原を感作させた粒径0.1~1 μ m程度のポリスチレンラテックス等の担体を用い、対応する抗原あるいは抗体により抗原抗体反応を起こさせると、反応液中の散乱光は増加し、透過光は減少する。この変化を吸光度あるいは積分球濁度として検出することにより被験サンプル中の抗原濃度などを測定することができる。

10

【0166】

本発明の抗体または該抗体断片は、糖鎖不全型IgA1ポリペプチドの重鎖ヒンジ領域に結合できるため、該ポリペプチドが発現している細胞の検出に好適に用いられる。

該ポリペプチドが発現している細胞の検出には、公知の免疫学的検出法を用いることができるが、免疫沈降法、免疫細胞染色法、および免疫組織染色法などが、好ましく用いられる。また、FMAT8100HTSシステム（アプライドバイオシステム社製）を用いる蛍光抗体染色法なども用いることができる。

【0167】

免疫沈降法とは、該ポリペプチドを発現した細胞などを本発明のモノクローナル抗体または抗体断片と反応させた後、プロテインG・セファロースなどのイムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体複合体を沈降させる方法である。あるいは以下のような方法によっても行うことができる。

20

ELISA用96ウェルプレートに上述した本発明の抗体または該抗体断片を固相化した後、BSA-PBSによりブロッキングする。抗体が精製されていない状態の例えばハイブリドーマ株培養上清などの精製されていない状態である場合には、抗マウスイムノグロブリンあるいはラットイムノグロブリンまたはプロテインAあるいはGなどをあらかじめELISA用96ウェルプレートに固相化しBSA-PBSでブロッキングした後、ハイブリドーマ株培養上清を分注して結合させる。BSA-PBSを捨てPBSでよく洗浄した後、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現している細胞や組織の溶解液を反応させる。よく洗浄した後のプレートより免疫沈降物をSDS-PAGE用サンプルバッファーで抽出し、上記のウエスタンブロットティングにより検出を行う。

30

【0168】

免疫細胞染色法および免疫組織染色法とは抗原を発現した細胞または組織などを、場合によっては抗体の通過性を良くするため界面活性剤やメタノールなどで処理した後、本発明の抗体を反応させ、さらにFITCなどの蛍光標識、ペルオキシダーゼなどの酵素標識、ビオチン標識などを施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、該標識を可視化し、顕微鏡にて顕鏡するか、あるいは蛍光標識の抗体と細胞を反応させ、フローサイトメーターにて解析する蛍光抗体染色法（フローサイトメトリー）である。例えば、文献〔Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック(1987)〕などに記載された方法を用いて行うことができる。特に、本発明の抗体または該抗体断片は、糖鎖不全型IgA1の重鎖ヒンジ領域に結合できるため、細胞膜上に天然型の立体構造を保持して発現しているCD27を検出するフローサイトメトリーの解析に好ましく用いられる。

40

【0169】

また、蛍光抗体染色法の原理を利用したFMAT8100HTSシステム（アプライドバイオシステム社製）を用いることにより、形成された抗体-抗原複合体と、抗体-抗原複合体の形成に関与していない遊離の抗体または抗原とを分離することなく、抗原量または抗体量を測定することができる。

5. 本発明の糖鎖不全型IgA1ポリペプチドを特異的に認識し、結合するモノクローナル抗体または該抗体断片を用いた疾患の治療方法

50

本発明の糖鎖不全型IgA1ポリペプチドを特異的に認識し、かつ該重鎖ヒンジ領域に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片は、糖鎖不全型IgA1ポリペプチドが関与する疾患の治療に用いることができる。

【0170】

糖鎖不全型IgA1ポリペプチドが関与する疾患としては、生体内において該ポリペプチドを発現している細胞が見出される疾患であればいかなるものでもよく、例えば、IgA腎症や癌などがあげられる。

更に、IgA腎症を発症し、ネフローゼ症候群を呈する疾患や腎不全を呈するものも、疾患としてあげることができる。

【0171】

癌としては、造血器由来の腫瘍（血液癌ともいう）や上皮由来の固形癌があげられる。

血液癌としては、具体的に白血病、リンパ腫（Hodgkin lymphoma、non-Hodgkin lymphoma）多発性骨髄腫などがあげられる。具体的なnon-Hodgkin lymphomaとしては、マンツル細胞リンパ腫、慢性リンパ性白血病、小リンパ性白血病、パーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、モルトリンパ腫、びまん性大細胞リンパ腫、形質細胞腫などがあげられる。

【0172】

固形癌としては、具体的に乳癌、子宮癌、大腸癌、胃癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌、直腸癌、甲状腺癌、子宮頸癌、小腸癌、前立腺癌または膵臓癌などがあげられる。

本発明の治療剤としては、本発明の抗体または該抗体断片を有効成分とする癌の治療剤があげられる。ADCC活性やCDC活性などのエフェクター活性を有するがん治療剤、あるいはアポトーシス誘導作用による癌の治療剤等も、本発明の治療剤として包含される。

【0173】

本発明の抗体または該抗体断片は、細胞膜に発現している糖鎖不全型IgA1ポリペプチドを認識することができるので、生体内で存在する糖鎖不全型IgA1ポリペプチドを発現している細胞を認識することができる。従って、本発明の抗体または該抗体断片で、かつエフェクター活性を有する抗体または該抗体断片は、in vivoおよびin vitroにおいて、糖鎖不全型IgA1ポリペプチドを発現している細胞を傷害することができる。また、このような本発明の抗体または該抗体断片は、生体内の糖鎖不全型IgA1ポリペプチド発現細胞を傷害し、減少させることができるので、治療剤として特に有効に用いられる。

【0174】

本発明の抗体または該抗体断片、またはこれらの誘導体を含む治療剤は、有効成分としての該抗体もしくは該抗体断片、またはこれらの誘導体のみを含むものであってもよいが、通常は薬理的に許容される1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。

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などの非経口投与をあげることができ、抗体またはペプチド製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。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、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤などがあげられる。

【0175】

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、顆粒剤などがあげられる。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、果糖などの糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミントなどのフレーバー類などを添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤などは、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトールなどの賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤などを添加剤として用いて製造できる。

10

20

30

40

50

【0176】

非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤などがあげられる。注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体などを用いて調製される。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸などの担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該抗体または抗体断片自体、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体または抗体断片を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体などを用いて調製される。担体として具体的には乳糖、グリセリンなどが例示される。該抗体または抗体断片および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダーなど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。

10

【0177】

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重などにより異なるが、通常成人1日当たり10 µg/kg ~ 8 mg/kgである。

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

【0178】

細胞膜上に糖鎖不全型IgA1を高発現するCHO細胞株の造成

(1) 膜型IgA発現プラスミドpKAN932B8PVHmIgAの構築

以下の手順により、細胞膜上に膜型イムノグロブリンAを発現するためのベクターpKAN932B8PVHmIgAを作製した。本プラスミドは特許W003/085107に記載の抗CD20抗体2B8Pの重鎖Fab部分を膜型イムノグロブリンの定常領域に連結した蛋白質を発現するプラスミドベクターである。

20

1. pCR2B8PVHの作製

抗CD20抗体2B8Pの重鎖可変領域を含む遺伝子断片を、特許W003/085107に記載されているプラスミドベクターpKANTEK932B8Pを鋳型として以下に示すPCR反応により増幅した。0.2mmol/L dNTPs、1mmol/L塩化マグネシウムを含む反応液に1ngのpKANTEK932B8P、1 µmol/L RitNotNheI fw (配列番号4)、1 µmol/L RitNotNheI rv (配列番号5) および2.5単位のKOD polymerase (東洋紡社製)を用いて、合計50 µLとし、PCR反応を行った。反応条件は98 15秒間、65 2秒間、74 30秒間のサイクルを25サイクルで行った。該反応液を2% アガロースゲル電気泳動で分離後、約450bpのPCR産物を、ZeroBlunt PCR Cloning Kit (インビトロジェン社製)を用いて添付の使用説明書に従って、pCR-Bluntベクターに導入し、配列番号6記載のDNA配列を有するpCR2B8PVHを取得した(図1)。

30

2. pCR1gAの作製

次に、イムノグロブリンAの定常領域を含むDNA断片を、GenebankにHomo sapiens cDNA クローンFLJ46724として登録されているプラスミド(NEDO human cDNA シークエンシングプロジェクトより分譲)を鋳型として以下に示すPCRを用いて増幅した。0.2mmol/L dNTPs、1mmol/L塩化マグネシウムを含む反応液に1ngのFLJ46724を含むプラスミド、1 µmol/L I g-a-NheI (配列番号7)、1 µmol/L I g-b-BamHI (配列番号8) および2.5単位のKOD polymerase (東洋紡社製)を用いて、合計50 µLとし、PCR反応を行った。反応条件は98 15秒間、68 30秒間のサイクルを25サイクルで行った。該反応液を1% アガロースゲル電気泳動で分離後、約1000bpのPCR産物を、Zero Blunt PCR Cloning Kit (インビトロジェン社製)を用いて添付の使用説明書に従って、pCR-Bluntベクターに導入し、配列番号9記載のDNA配列を有するpCR1gAを取得した(図2)。

40

3. pCRmIgAの作製

次に、0.2mmol/L dNTPs、1mmol/L塩化マグネシウムを含む反応液に0.02 µmol/LのAMD-A (配列番号10)、0.02 µmol/LのAMD-B (配列番号11)、1 µmol/LのAMDBamHI fw (配列番号12)、1 µmol/LのAMDSpeI rv (配列番号13) および2.5単位のKOD polymerase (東洋紡社製)を用いて、合計50 µLとし、PCR反応を行った。反応条件は98 15秒間、6

50

5 2秒間、74 30秒間、のサイクルを25サイクルで行った。該反応液を2%アガロースゲル電気泳動で分離後、約450bpのPCR産物を、ZeroBluntPCR Cloning Kit (インビトロジェン社製)を用いて添付の使用説明書に従って、pCR-Bluntベクターに導入し、配列番号14記載のDNA配列を有するpCRmIgAを取得した(図3)。

4 . pCR 2B8P mIgA の作製

上記1項で作製したpCR2B8PVHを制限酵素NotIおよび制限酵素NheIで消化して得られる約450bpのDNA断片、および上記2項で作製したpCRmIgAを制限酵素NheIおよび制限酵素BamHIで消化して得られる約1000bpのDNA断片を、上記3項で作製したpCRmIgAを制限酵素NotIおよび制限酵素BamHIで消化して得られる約3.5KbpのプラスミドDNAに連結することにより、抗CD20抗体2B8Pの重鎖可変領域が膜型イムノグロブリンの重鎖定常領域に連結したDNAをコードするプラスミドpCR 2B8P mIgA を構築した(図4)。本プラスミドにコードされる膜型IgA1配列(重鎖)を配列番号15に示した。

5 . pKAN932B8PVHmIgAの構築

上記4項で作製したpCR 2B8P mIgAを制限酵素NotIおよび制限酵素SpeIで消化して得られる1580bpのDNA断片、およびKANTEX932B8Pを制限酵素EcoRIおよび制限酵素NotIで消化して得られる2845bpのDNA断片を、同じくpKANTEX932B8Pを制限酵素EcoRIおよび制限酵素SpeIで消化して得られる約13.5KbpのDNA断片に連結することにより、抗CD20抗体2B8Pの定常領域が膜型イムノグロブリンAである蛋白質を発現するプラスミドpKAN932B8PVHmIgA を作製した(図5)。該発現ベクターを用いて形質転換した大腸菌を、100 mLのLB培地に播種し、一晚培養を行った後に、菌体を回収し、Qiafilter Plasmid midi kit (キアゲン社製)を用いて添付のプロトコールに従ってプラスミドを精製した。精製後、30 μgのプラスミドベクターを制限酵素AatII消化により、線状化した。線状化後、フェノール・クロロフォルム抽出、エタノール沈殿を行い、1/10濃度TEバッファー(1mMTrisHCl, 0.1mM EDTA)に溶解した後、濃度を測定し、遺伝子導入に供した。

(2) 膜型イムノグロブリンA発現プラスミドpKAN932B8PVHmIgAの導入

pKAN932B8PVHmIgAを、Tn型糖鎖を主に発現する変異CHO細胞であるLec8細胞、および正常型糖鎖を主に発現するCHO/DG44細胞に遺伝子導入することにより、膜型イムノグロブリンAを発現するLec8細胞およびDG44細胞の樹立を行った。CHO/DG44細胞(以下、DG44と記す)あるいはLec8細胞への膜型イムノグロブリンA発現プラスミドpKAN932B8PVHmIgAの導入は、エレクトロポレーション法[サイトテクノロジー, 3, 133 (1990)]に準じて、以下の手順で行った。まず、基本培地[10% ウシ胎児透析血清(インビトロジェン社)および50 μg/mL Gentamycin (ナカライテスク社)および1×HT supplement (インビトロジェン社製)を添加したIscove's Modified Dulbecco's Medium(インビトロジェン社)]で継代したDG44細胞を、K-PBS緩衝液[137mmol/L KCl, 2.7mmol/L NaCl, 8.1mmol/L Na₂HPO₄, 1.5mmol/L KH₂PO₄, 4.0mmol/L MgCl₂]に懸濁して8×10⁶個/mLとし、細胞懸濁液を調製した。調製した細胞懸濁液200 μL(1.8×10⁶個)を上記(1)で調製した線状化プラスミドpKAN932B8PVHmIgA 10 μgと混和した。但しLec8細胞の継代は、1×HT supplementを添加しない基本培地(以下、HT-培地と記す)で行った。該細胞DNA混和液をGene Pulser Cuvette(電極間距離2mm)(BIO-RAD社)へ移した後、遺伝子導入装置Gene Pulser(BIO-RAD社)を用いて、パルス電圧0.35 KV、電気容量250 μFの条件で遺伝子導入を行った。該細胞懸濁液を、30mLのHT-培地[10% ウシ胎児透析血清(インビトロジェン社製)および50 μg/mL Gentamycin (ナカライテスク社)を添加したIscove's Modified Dulbecco's Medium(インビトロジェン社製)]に混和し、100 μL/ウェルとなるように3枚の96ウェルプレートに播種した。播種2日後に500 μg/mL G418を含む継代用培地に交換し、10日間培養を行った。10日後、50nM MTX (Sigmaaldrich社製)を含むHT-培地に交換し、MTX耐性株を取得した。Lec8株由来の膜型イムノグロブリン発現株をmIgA/Lec8、一方、DG44細胞由来の膜型イムノグロブリンA発現細胞をmIgA/DG44と命名した。

【実施例2】

【0179】

糖鎖不全型IgA1-Fc融合タンパク質の調製

10

20

30

40

50

可溶性mIgA1タンパク質を取得するため、mIgA1細胞外領域部分とヒトIgG4Fcを連結したFc融合タンパク質mIgA1-Fcを設計した。具体的には、PCR法により、mIgA1細胞外領域の一部とヒトIgG4Fcを連結した遺伝子断片を作製し、これを実施例1で得られたpKAN932B8PVH mIgA1に挿入することにより、Fc融合mIgA1発現ベクターpKANTEX-mIgA1-Fcを調製した。この発現ベクターをCHO/DG44細胞株およびLec8細胞株に導入し、G418を培地中に500 μg/mL添加することにより、遺伝子導入細胞を選択した。選択された遺伝子導入細胞を無血清培地Excell-302 (SAFC社) 中で一週間培養し、mIgA1-Fcを含む培養上清を得た。培養上清約1LよりMabselect (GE Healthcare社) カラムを用いて、添付の説明書に従い精製し、DG44由来mIgA1-Fcを、Lec8由来mIgA1-Fc各5mg程度を取得した。得られた各mIgA1-Fcを、SDS-PAGE解析に供し、分子量および精製度を調べた(図6)。また、精製蛋白質の修飾糖鎖を確認する目的で、以下の酵素免疫測定法を実施した。96穴のEIA用プレート(Greiner社)に、DG44由来またはLec8由来mIgA1-Fc、あるいはヒトIgG4 (SIGMA社) を1 μg/mL、50 μL/穴で分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1%BSA-PBSを100 μL/穴に加え、室温1時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、1次抗体として、PBSで希釈したマウス抗ヒトIgA1モノクローナル抗体B3506B4 (Beckman Coulter社) またはマウス抗Tn抗原抗体22-1-1 (MBL社) を、50 μL/穴で分注し2時間反応させた。0.05% tween-PBSで洗浄後、2次抗体として希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG1抗体 (DAKO社) を50 μL/穴で加えて室温、1時間反応させ、0.05% tween-PBSで洗浄後ABTS [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)アンモニウム] 基質液 [1 mmol/LABTS, 0.1 mol/Lクエン酸バッファー (pH4.2), 0.1% H₂O₂] を用いて発色させ、サンプル波長415nm、リファレンス波長490nmにおける吸光度(OD₄₁₅-OD₄₉₀)をプレートリーダー (MULTISKAN SPECTRUM; Thermo社) を用いて測定した。その結果、DG44由来およびLec8由来mIgA1-Fcに対して抗IgA1抗体の結合が確認された一方で、Lec8由来mIgA1-Fcに対してのみ抗Tn抗原抗体の結合が確認された(図7)。以上のことから、Lec8由来mIgA1-FcがTn抗原型O結合型糖鎖を有することが確認された。

10

20

【実施例3】

【0180】

Tn抗原付加型IgA1のヒンジ領域に対するモノクローナル抗体の作製

(1) 免疫原としての糖ペプチドの調製

ヒトIgA1 (IgA1) ヒンジ領域アミノ酸配列 (アミノ末端から数えて223番目から240番目までのアミノ酸) の230番目と232番目のセリン (Ser) と、225番目と228番目および236番目のスレオニン (Thr) にN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) を結合で付加し、さらにキャリア蛋白との結合のためにアミノ末端にシステイン (Cys) を付加したペプチドを自動合成機 (島津製作所) を用いて合成した (Tn付加型IgA1ヒンジペプチド、配列番号16)。免疫原性を高める目的で以下の方法でKLH (和光純薬社) 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に溶解して10mg/mLに調整し、1/10容量の25mg/mL MBS [N-(m-Maleimidobenzoyloxy)-succinimide] (ナカライテスク社) を滴下して30分間攪拌反応させる。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フリーのMBSを除いて得られたKLH-MBSの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、攪拌反応させる。反応後、PBSで透析したものを免疫原とした。

30

40

(2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

(1) に示した方法により調製したTn抗原付加型IgA1ヒンジペプチド-KLHコンジュゲート100 μgをアルミニウムゲル2mgおよび百日咳ワクチン (千葉県血清研究所製) 1 × 10⁹細胞とともに4週令雌SDラット (日本エスエルシー社) に投与し、2週間後より100 μgのコンジュゲートを1週間に1回、計4回投与した。尾静脈より採血し、Tn抗原付加ヒト血漿由来IgA1に対する反応性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ラットから最終免疫3日後に脾臓を摘出した。脾臓をMEM培地 (日水製薬社) 中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離 (1200rpm、5分間) した後、上清を捨て、トリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH7.65) で1~2分間処理し赤血球を除去し、MEM培地で3回洗浄し、細胞融合に

50

用いた。

(3) 酵素免疫測定法

アッセイ用の陰性対照抗原としてヒト血漿由来IgA1 (BIOPUR社)、陽性対照抗原としてTn抗原型ヒトIgA1を用いた。Tn抗原型ヒトIgA1は、ヒト血漿由来IgA1に α -Galactosidase (ProZyme社、GKX-5013) を5U/mL、Neuraminidase (ナカライ社、24229-61) を1U/mLで37℃、一晩作用させて、正常糖鎖をTn抗原に変換することにより得た。また、Tn抗原のみを認識する抗体を除外する目的で、ヒト血漿由来C1インヒビター蛋白質 (ZLBベーリング、製品名ベリナート) をIgA1と同様に酵素処理して得られたTn抗原型C1インヒビターも陰性対照抗原として用いた。96穴のEIA用プレート (グライナー社) に、それぞれ2.5 μ g/mL、50 μ L/穴で分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1%BSA-PBSを100 μ L/穴で加え、室温1時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、1次抗体としてハイブリドーマの培養上清もしくは被免疫ラット抗血清を50 μ L/穴で分注し2時間反応させた。0.05% tween-PBSで洗浄後、2次抗体として希釈したペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン (ダコ社) を50 μ L/穴で加えて室温、1時間反応させ、0.05% tween-PBSで洗浄後ABTS [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) アンモニウム] 基質液 [1mmol/L ABTS, 0.1mol/Lクエン酸バッファー (pH4.2), 0.1% H_2O_2] を用いて発色させ、サンプル波長415nm、リファレンス波長490nmにおける吸光度 (OD415-OD490) をプレートリーダー (Emax; Molecular Devices社) を用いて測定した。

(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-U1を正常培地で培養し、細胞融合時に 2×10^7 以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

(5) ハイブリドーマの作製

(2) で得られたラット脾細胞と(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 (1200rpm、5分間) した後、上清を捨て、沈澱した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら37℃でポリエチレングリコール-1000 (PEG-1000) 1g、MEM培地1mLおよびジメチルスルホキシド0.35mLの混液を 10^8 個のマウス脾細胞あたり0.5mL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。遠心分離 (900rpm、5分間) 後、上清を捨て、ゆるやかに細胞をほぐした後、メスピペットによる吸込み、吸出しでゆるやかに細胞をHAT培地 [10%ウシ胎児血清添加RPMI培地にHATMediaSupplement (Invitrogen者) を加えた培地] 100mL中に懸濁した。この懸濁液を96穴培養用プレートに200 μ L/穴ずつ分注し、5%CO₂インキュベーター中、37℃で10~14日間CO₂5%下で培養した。この培養上清を(3) に記載した酵素免疫測定法で調べ、Tn抗原型ヒトIgA1に特異的に反応する穴を選び、2回クローニングを繰り返して、抗Tn抗原付加mIgAヒンジペプチドモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株KM4137、4138、4139、4140、4144を確立した。サブクラス特異的な二次抗体を用いた酵素免疫測定法により抗体クラスを調べ、KM4137、KM4138、KM4139、KM4144はラットIgG2a、KM4140はラットIgG2bと決定された。これらの抗体クラスを表2に示す。

【0181】

【表2】

KM No.	動物種	抗体クラス
KM4137	ラット	IgG2a
KM4138	ラット	IgG2a
KM4139	ラット	IgG2a
KM4140	ラット	IgG2b
KM4144	ラット	IgG2a

【0182】

なお、(1) 項で調製した糖ペプチド-KLH融合蛋白質をBalb/cマウス、およびBxSB狼瘡

10

20

30

40

50

マウスに免疫する実験も複数回実施したが、Tn抗原型ヒンジ領域に特異的なモノクローナル抗体は得ることができなかつた。また、実施例1で樹立した、Tn抗原型IgA1を細胞膜上に高発現するCHO細胞株(mIgA/Lec8)をSDラット、およびBalb/cマウスに免疫する実験も複数回実施したが、Tn抗原型ヒンジ領域に特異的なモノクローナル抗体は得ることができなかつた。さらに、実施例2で調製した、Tn抗原型IgA1-Fc融合蛋白質をSDラット、およびBalb/cマウスに免疫する実験も複数回実施したが、Tn抗原型ヒンジ領域に特異的なモノクローナル抗体は得ることができなかつた。

(6) 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(5)で得られたハイブリドーマ株を $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹それぞれ腹腔内注射した。10~21日後に、ハイブリドーマは腹水癌化した。腹水のたまったマウスから、腹水を採取(1~8mL/匹)し、遠心分離(3000rpm、5分間)して固形分を除去した後カプリル酸沈殿法(Antibodies-A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)により精製し、精製モノクローナル抗体とした。

10

【実施例4】

【0183】

抗Tn抗原付加mIgAヒンジペプチドモノクローナル抗体の反応性

(1) バインディングELISA

実施例3の(3)に記載した酵素免疫測定法により、得られたモノクローナル抗体の反応特異性を検討した。KM4137~4140およびKM4144はいずれもTn抗原型ヒトIgA1に特異的に反応性し、ヒトIgA1やTn抗原型C1インヒビターには反応しなかつた(図8)。

20

(2) 競合酵素免疫測定法

樹立したモノクローナル抗体の結合特異性を評価する目的で、以下の競合酵素免疫測定法を実施した。96穴のEIA用プレート(Greiner社)に、実施例3の(3)で調製したTn抗原型ヒトIgA1を $2.5 \mu\text{g/mL}$ 、 $50 \mu\text{L}$ /穴で分注し、4で一晚放置して吸着させた。洗浄後、1%BSA-PBSを $100 \mu\text{L}$ /穴で加え、室温1時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、競合物質としてTn抗原型ヒトIgA1、もしくはヒト血漿由来IgA1を $25 \mu\text{L}$ /穴で分注し、更に1次抗体として、実施例3で樹立した各ハイブリドーマの培養上清を抗体濃度 $1 \mu\text{g/mL}$ 程度に調製し、 $25 \mu\text{L}$ /穴で分注し2時間反応させた。0.05% tween-PBSで洗浄後、2次抗体として希釈したペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン(DAKO社)を $50 \mu\text{L}$ /穴で加えて室温、1時間反応させ、0.05% tween-PBSで洗浄後ABTS[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)アンモニウム]基質液[1mmol/LABTS, 0.1mol/Lクエン酸バッファー(pH4.2), 0.1%過酸化水素水]を用いて発色させ、サンプル波長415nm、リファレンス波長490nmにおける吸光度(OD415-OD490)をプレートリーダー(MULTISKAN SPECTRUM; Thermo社)を用いて測定した。陰性対照抗体としてはラット抗Avermectin抗体KM1762、陽性対照としてラット抗ヒトIgAモノクローナル抗体LO-HA-9(P.A.R.I.S社)を用いた。その結果、Tn抗原型ヒトIgA1を競合物質に用いた場合、樹立したモノクローナル抗体は競合物質濃度依存的に吸収を受け、更にヒト血漿由来IgA1を競合物質に用いた場合と比較して100~1000倍程度低い競合物質濃度において吸収されることが明らかとなった(図9)。以上のことより、樹立したモノクローナル抗体はいずれもTn抗原型ヒトIgA1に対して高い結合特異性を有していることが示された。

30

40

(3) Tn抗原型ヒトIgA1、もしくはヒト血漿由来IgA1に対する結合活性測定

表面プラスモン共鳴法による結合活性測定を行った。以下の操作は全てBiacoreT-100(Biacore社)を用いて行った。抗マウスイムノグロブリン抗体(ピアコア社)を、アミンカップリング法によりCM5センサーチップ(Biacore社)に固相化し、抗体濃度既知の各ハイブリドーマの培養上清をチップ上に流し、各抗体をキャプチャーさせた。その後、HBS-EP+緩衝液(Biacore社)を用いて $2 \mu\text{g/mL}$ から6段階に希釈したTn抗原型ヒトIgA1、もしくはヒト血漿由来IgA1を $30 \mu\text{L/min}$ の速度でチップ上に流し、各濃度におけるセンサーグラムを解析し、カイネティクス解析(1:1結合モデル)を用いて、各抗体のTn抗原型ヒトIgA1に対する結合速度定数及び解離速度定数を算出した。Biacore-T100の内部温度は25に

50

設定し、抗体の結合毎にpH1.5のグリシン緩衝液(Biacore社)でチップを再生した。その結果、いずれのモノクローナル抗体も、Tn抗原型ヒトIgA1に対して解離定数 10^{-8} [M]程度の親和性を示したのに対し、ヒト血漿由来IgA1に対しては結合が認められなかった(表3)。以上のことから、樹立したモノクローナル抗体はいずれもTn抗原型ヒトIgA1に対して高い結合特異性と高い親和性を有していることが示された。

【0184】

【表3】

	k_a [1/Ms]	k_d [1/s]	K_D [M]
KM4137	4.07×10^4	7.13×10^{-4}	1.75×10^{-8}
KM4138	3.83×10^3	7.65×10^{-4}	2.00×10^{-7}
KM4139	4.21×10^4	6.21×10^{-4}	1.47×10^{-8}
KM4140	1.68×10^4	1.24×10^{-3}	7.40×10^{-8}
KM4144	4.36×10^4	8.87×10^{-4}	2.03×10^{-8}

10

【0185】

(4) mIgA1発現トランスフェクタントとの反応性評価

実施例(1)で樹立したmIgA1発現DG44細胞株およびmIgA1発現Lec8細胞株の 5×10^5 細胞を、樹立した各ハイブリドーマの培養上清50 μ Lで懸濁し、4で1時間反応させた。反応後、0.05%Na₃を含むPBSを用いて3回遠心分離して洗浄した後、Alexa488標識ヤギ抗ラットIgG(H+L)抗体(Invitrogen社)もしくはAlexa488標識ヤギ抗マウスIgG(H+L)抗体(Invitrogen社)を1%BSA-PBSで300倍希釈した溶液を50 μ L添加して懸濁後、4で1時間反応させた。反応後、0.05%Na₃を含むPBSを用いて3回遠心分離して洗浄した後、500 μ Lの0.05%Na₃を含むPBSに懸濁し、フローサイトメーターFACS Calibur(BD Biosciences社)を用いて解析を行った。陰性対照抗体としてはマウス抗ND28モノクローナル抗体KM511(日本特開平08-165300号)またはラット抗Avermectinモノクローナル抗体KM1762(ClinCancerRes. 2005 May1;11(9):3494-502)、陽性対象としてマウス抗Tn抗原モノクローナル抗体22-1-1(MBL社)あるいはラット抗ヒトIgAモノクローナル抗体LO-HA-9(P.A.R.I.S社)を用いた。その結果、樹立したモノクローナル抗体は、いずれもmIgA1発現DG44細胞に結合せず、mIgA1発現Lec8細胞に特異的に結合することが確認された(図10)。mIgA1発現Lec8細胞はTn抗原型mIgA1を発現していることから、樹立したモノクローナル抗体は、細胞表面上に存在しているTn抗原型mIgA1を認識できることが示唆された。

20

30

(5) ヒト血清中におけるTn抗原型IgA1の定量

ヒト血清中での糖鎖不全IgA1検出系の構築を目的として、以下の酵素免疫測定法を実施した。被検物質としてTn抗原型ヒトIgA1あるいはヒト血漿由来IgA1をヒト血清(SIGMA社)で希釈したものをを用いた。実施例3で精製したKM4137、KM4140、KM4144、またはラット抗ヒトIgAモノクローナル抗体LO-HA-9(P.A.R.I.S社)をx μ g/mL、50 μ L/穴で分注し、4で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1%BSA-PBSを100 μ L/穴に加え、室温1時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、PBSで希釈した被検物質を50 μ L/穴で分注し1時間反応させた。0.05% tween-PBSで洗浄後、2次抗体として希釈したペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒトIgA1モノクローナル抗体B3506B4(Beckman Coulter社)を50 μ L/穴で加えて室温、1時間反応させ、0.05% tween-PBSで洗浄後ABTS[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)アンモニウム]基質液[1mmol/LABTS,0.1mol/Lクエン酸バッファー(pH4.2),0.1%過酸化水素水]を用いて発色させ、サンプル波長415nm、リファレンス波長490nmにおける吸光度(OD415-OD490)をプレートリーダー(MULTISKAN SPECTRUM;Thermo社)を用いて測定した。その結果、抗ヒトIgAモノクローナル抗体を吸着させたプレートにおいては、Tn抗原型ヒトIgA1あるいはヒト血漿由来IgA1のいずれも同様に検出される一方で、樹立したKM4137、KM4140、KM4144を吸着させたプレートにおいては、Tn抗原型ヒトIgA1のみが添加濃度依存的に検出された(図11)。以上のことから、KM4137、KM4140、KM4144を用いた酵素免疫測定法により、糖鎖不全ヒトIgA1の

40

50

みを特異的に検出し、定量することが可能であることが示された。

【実施例 5】

【0186】

樹立した抗Tn抗原付加mIgAヒンジペプチドモノクローナル抗体KM4137、KM4140およびKM4144の競合阻害活性を評価する目的で、以下の競合酵素免疫測定法を実施した。96穴のnunc maxisorpプレート（NUNC社）に、実施例3の（3）で調製したTn抗原型ヒトIgA1を25 μg/mL、50 μL/穴で分注し、4 で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1%BSA-PBSを200 μL/穴で加え、室温1時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、競合物質として、実施例3で精製した抗Tn抗原付加mIgAヒンジペプチドモノクローナル抗体KM4137、KM4140またはKM4144を25 μL/穴で分注し、更に1次抗体として、実施例3で精製した抗Tn抗原付加mIgAヒンジペプチドモノクローナル抗体をビオチンラベル化したビオチンラベルKM4137、ビオチンラベルKM4140およびビオチンラベルKM4144をそれぞれ2 μg/mL、0.16 μg/mLおよび10 μg/mLに調製し、それぞれ25 μL/穴で分注し1時間反応させた。0.05% tween-PBSで洗浄後、2次抗体として希釈したペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（Sigma-Aldrich社）を50 μL/穴で加えて室温、1時間反応させ、0.05% tween-PBSで洗浄後ABTS [2,2-アジノピス（3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸）アンモニウム] 基質液 [1mmol/LABTS,0.1mol/Lクエン酸バッファー（pH4.2）,0.1%過酸化水素水] を用いて発色させ、サンプル波長415nm、リファレンス波長490nmにおける吸光度（OD415-OD490）をプレートリーダー（MULTISKAN SPECTRUM;Thermo社）を用いて測定した。陰性対照抗体としてはラット抗Avermectin抗体KM1762を用いた。その結果、樹立した抗Tn抗原付加mIgAヒンジ領域において互いに競合しあうことが示された（図12）。

10

20

【産業上の利用可能性】

【0187】

本発明により、ガラクトースが結合していないセリンスレオニン結合型糖鎖を含む免疫グロブリンA1の重鎖遺伝子によりコードされるポリペプチドのヒンジ領域を特異的に認識し、結合するモノクローナル抗体または該抗体断片、ならびに該抗体または抗体断片を用いる診断薬、または該抗体または抗体断片を有効成分として含有する治療薬を提供することができる。

30

【受託番号】

【0188】

IPOD FERM BP-11214

IPOD FERM BP-11215

IPOD FERM BP-11216

【配列表フリーテキスト】

【0189】

配列番号1-ヒトIgA1ヒンジ領域 アミノ酸配列

配列番号2-ヒトIgA1重鎖 アミノ酸配列

配列番号3-ヒトIgA1ヒンジ領域 DNA配列

配列番号4-人工配列の記載：RitNotNheI fw

配列番号5-人工配列の記載：RitNotNheI rv

配列番号6-人工配列の記載：pCR2B8PVH

配列番号7-人工配列の記載：Ig-a-NheI

配列番号8-人工配列の記載：Ig-b-BamHI

配列番号9-人工配列の記載：pCR1gA

配列番号10-人工配列の記載：AMD-A

配列番号11-人工配列の記載：AMD-A

配列番号12-人工配列の記載：AMDBamHI fw

配列番号13-人工配列の記載：AMDSpeI rv

配列番号14-人工配列の記載：pCRmIgA

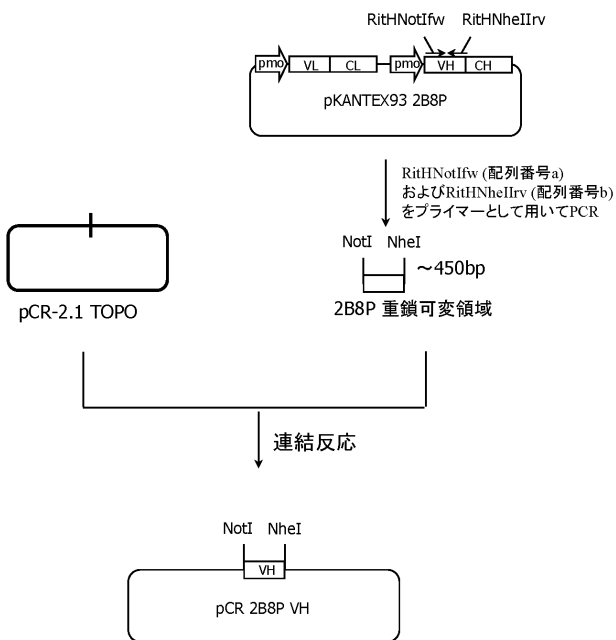
40

50

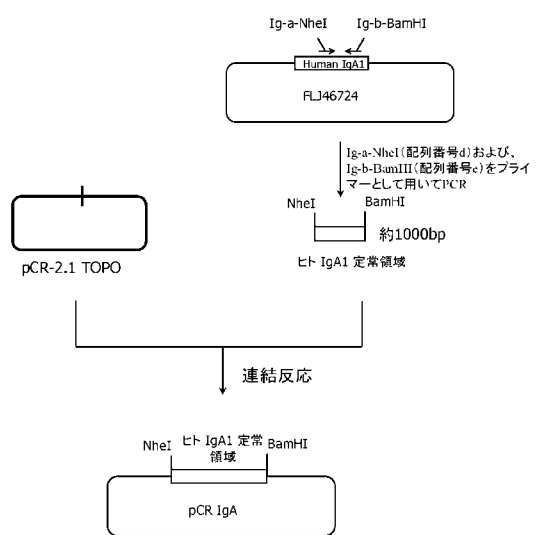
配列番号15-人工配列の記載：膜型IgA1配列

配列番号16-Tn付加型IgA1ヒンジペプチド アミノ酸配列

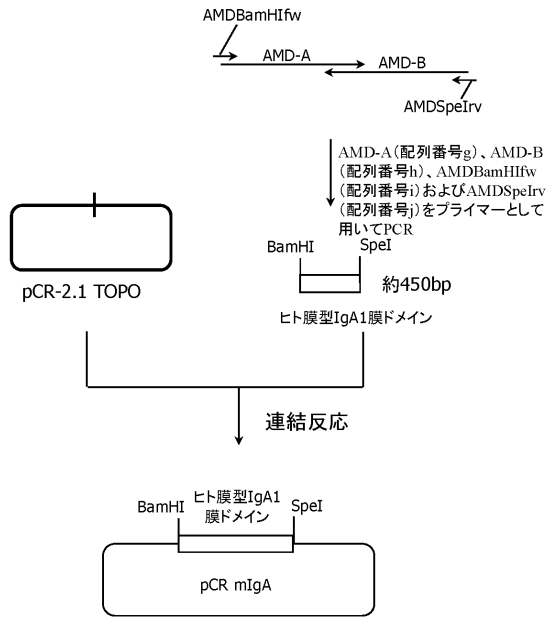
【 図 1 】



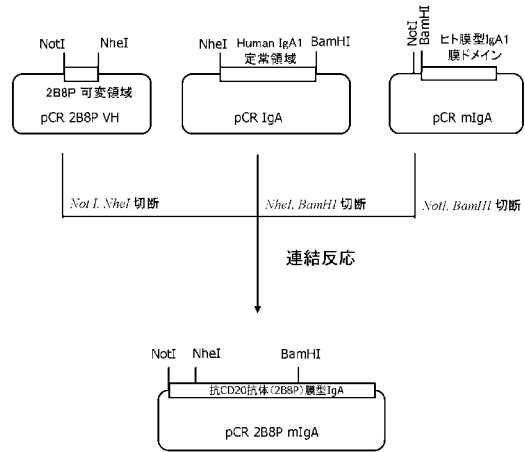
【 図 2 】



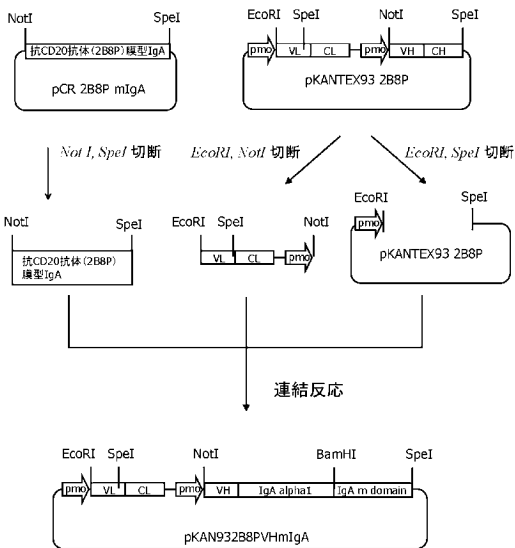
【 図 3 】



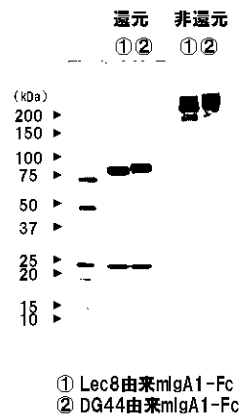
【 図 4 】



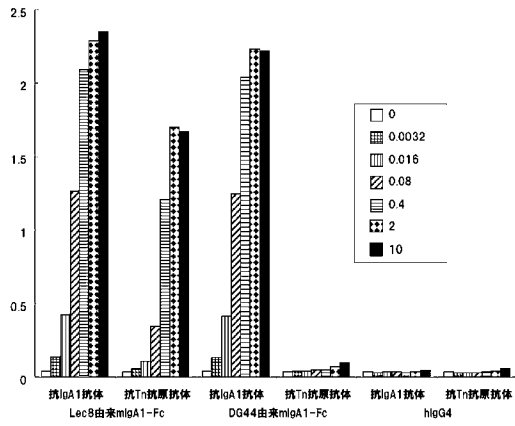
【 図 5 】



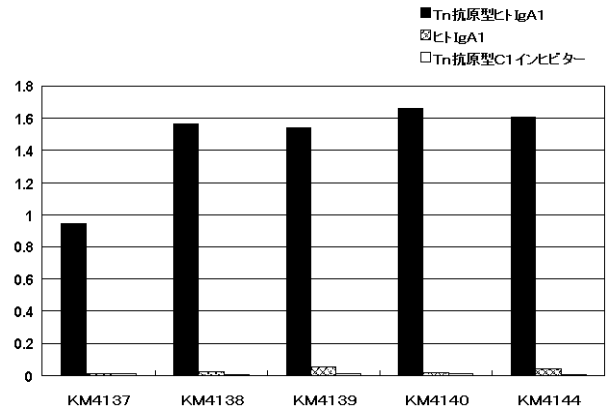
【 図 6 】



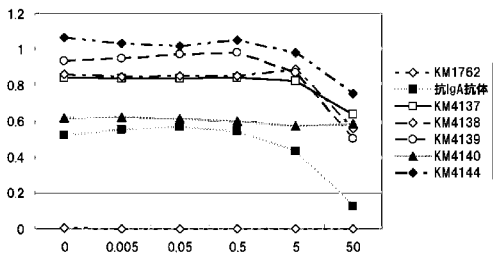
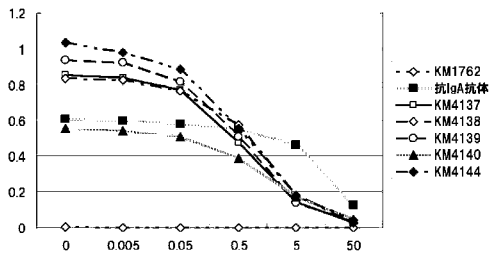
【 図 7 】



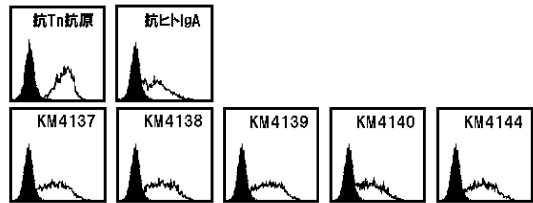
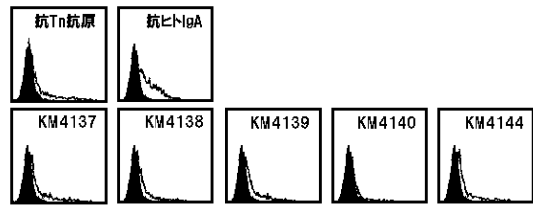
【 図 8 】



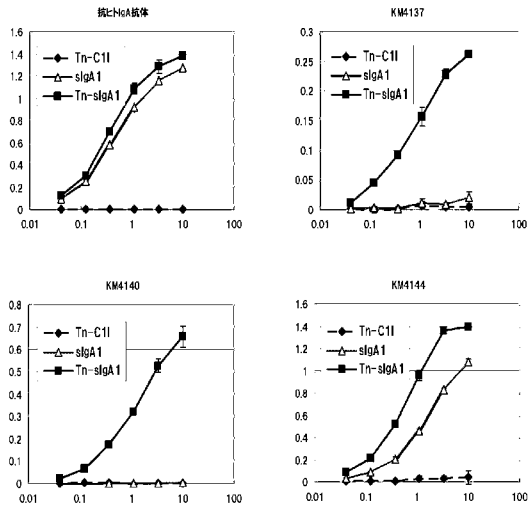
【 図 9 】



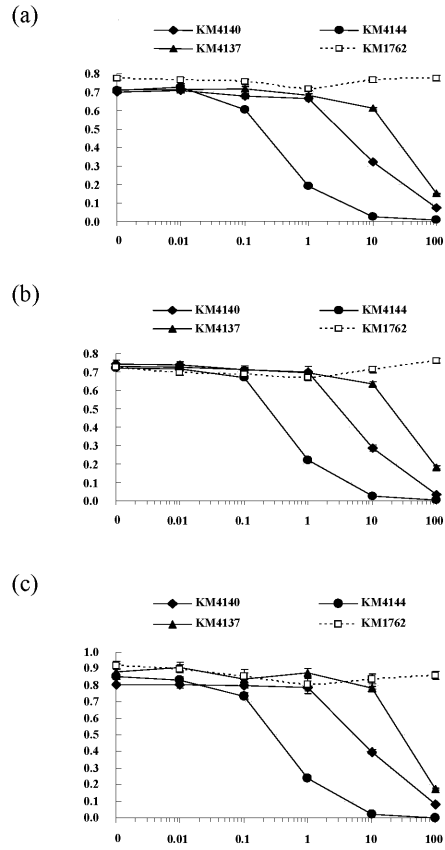
【 図 10 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 配 列 表 】

2011081189000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2010/073737
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER See extra sheet. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, A61K39/395, A61P13/12, A61P37/02, C07K16/42, C07K16/46, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/02, C12P21/08, G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUZUKI H. et al., Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity., J. Clin. Invest. (June 2009) vol. 119, pages 1668-1677, a whole document, particularly, page 1668, 'Summary', page 1669, right column to page 1670, left column, 'Characterization of antibodies specific for Gal-deficient IgA1 secreted by IgG-producing cell lines.', fig. 3B	1-26, 30-32
X	Yoshiyuki HIKI, "Pathogenetic Analyses of IgA nephropathy from the aspect of O-glycans in IgA1 hinge region", Japanese Journal of Pediatric Nephrology(2009 Nen 11 Gatsu), vol.22, pages 141 to 146, page 143, right column, the last paragraph to page 144, left column, 1st paragraph	1-26, 30-32
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 March, 2011 (22.03.11)		Date of mailing of the international search report 05 April, 2011 (05.04.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/073737

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Koichiro YAMAMOTO et al., "Ko-gosei Hito IgA1 Hinge Kotai o Mochiita IgA Jinsho Tokuiteki Tosa Fuzen IgA1 no Kensaku", The Japanese Journal of Nephrology(2009 Nen 4 Gatsu), vol.51, page 292, 03-14-07, a whole document	1-26,30-32
A	KAWASAKI Y. et al., FB21, a monoclonal antibody that reacts with a sialic-acid-dependent carbohydrate epitope, is a marker for glomerular endothelial cell injury., Am. J. Kidney Dis. (2004) vol. 44, pages 239-249	1-26,30-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/073737

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i,
A61P37/02(2006.01)i, C07K16/42(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i,
C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i,
C12N5/10(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i,
G01N33/53(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/073737

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 27-29
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 27 to 29 pertain to diagnostic methods to be practiced on human being and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 0 / 0 7 3 7 3 7	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. 特別ページ参照			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, A61K39/395, A61P13/12, A61P37/02, C07K16/42, C07K16/46, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/02, C12P21/08, G01N33/53			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X	SUZUKI H. et al., Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity., J. Clin. Invest. (June 2009) vol. 119, pages 1668-1677, 全体、特に第1668頁の‘要旨’の項、第1669頁の右欄-第1670頁の左欄に掛けるの‘Characterization of antibodies specific for Gal-deficient IgA1 secreted by IgG-producing cell lines.’の項の記載、及びFigure 3 B	1-26, 30-32	
X	比企能之, IgA腎症の病因解析-IgA1ヒンジ部糖鎖からのアプローチ-, 日本小児腎臓病学会雑誌 (2009年11月) 第22巻, 第141-146頁、第143頁の右欄最終段落-第144頁左欄第1段落の記載	1-26, 30-32	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献	
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 22.03.2011		国際調査報告の発送日 05.04.2011	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 石丸 聡	4 B 3 7 7 7
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 0 / 0 7 3 7 3 7

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	山本幸一郎 他6名, 抗合成ヒト I g A 1 ヒンジ抗体を用いた I g A 腎症特異的糖鎖不全 I g A 1 の検索, 日本腎臓学会誌 (2009年4月) 第51巻, 第292頁, O3-14-07、全体	1-26, 30-32
A	KAWASAKI Y. et al., FB21, a monoclonal antibody that reacts with a sialic-acid-dependent carbohydrate epitope, is a marker for glomerular endothelial cell injury., Am. J. Kidney Dis. (2004) vol. 44, pages 239-249	1-26, 30-32

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2010/073737

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 27-29 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項27-29はヒトの診断方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2010/073737

発明の属する分野の分類

C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i,
C07K16/42(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i,
C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i,
G01N33/53(2006.01)i

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 U	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 N	
G 0 1 N 33/564 (2006.01)	G 0 1 N 33/577 B	
	G 0 1 N 33/564 Z	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO , NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 神田 豊

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 2 0 3 7、9 4 2 0 アシーナ サークル ラ ジョラ、
キョウワハッコウキリンカリフォルニア、インコーポレイテッド内

(72)発明者 佐藤 光男

東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 協和発酵キリン株式会社 本社内

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA58 CA01 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04 GA11
HA15
4B064 AG27 CA19 CA20 CC24 CE10 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA87X AA90Y AB01 AB02 AC14 BA02 BA08 CA25
CA44 CA46
4C085 AA14 AA16 BB31 BB41 BB43 CC23 DD62 DD63 EE01 GG03
GG08
4H045 AA11 AA20 AA30 BA09 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74 GA21

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	抗IgA1抗体		
公开(公告)号	JPWO2011081189A1	公开(公告)日	2013-05-13
申请号	JP2011547720	申请日	2010-12-28
申请(专利权)人(译)	协和発酵キリン株式会社		
[标]发明人	金子悦士 佐々木由香 森勝弘 神田豊 佐藤光男		
发明人	金子悦士 佐々木由香 森勝弘 神田豊 佐藤光男		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/42 C12P21/08 C07K16/46 C12N15/02 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61P37/02 A61P13/12 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/564		
CPC分类号	A61P13/12 A61P37/02 C07K16/4283 C07K2317/34 C07K2317/92 G01N2800/34 A61K38/17 A61K38/20 A61K39/395 A61K48/00 C07K14/435 C07K14/54 C07K16/18 C07K16/22 C07K16/24 C07K16/28 C07K16/42		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/42 C12P21/08 C07K16/46 C12N15/00.C C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N5/00.102 A61K39/395.U A61P37/02 A61P13/12 G01N33/53.N G01N33/577.B G01N33/564.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA58 4B024/CA01 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE10 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB31 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4C085/GG03 4C085/GG08 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA21		
优先权	2009296706 2009-12-28 JP		
其他公开文献	JP5850748B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的一个目的是特异性识别由免疫球蛋白A1的重链基因编码的多肽的铰链区，该免疫球蛋白A1含有不结合半乳糖的丝氨酸-苏氨酸连接的糖链，对诊断IgA肾病有效。但是，需要结合的单克隆抗体。根据本发明，半乳糖特异性地识别由包含丝氨酸-苏氨酸连接的糖链的免疫球蛋白A1的重链基因和结合的单克隆抗体或其抗体片段所编码的多肽的铰链区，可以提供使用抗体或抗体片段的诊断剂，以及含有抗体或抗体片段作为有效成分的治疗剂。

発行日 平成25年5月13日 (2013.5.13)

(43) 国際公開日 平成23年7月7日 (2011.7.7)

(5) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K	16/42	(2006.01)	C O 7 K 16/42		4 B O 6 4
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08		4 B O 6 5
C O 7 K	16/46	(2006.01)	C O 7 K 16/46		4 C O 8 5
C 1 2 N	15/02	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	C	4 H O 4 5
			審査請求 未請求	予備審査請求 未請求	(全 59 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2011-547720 (P2011-547720)	(71) 出願人	000001029 協和発酵キリン株式会社
(2) 国際出願番号	PCT/JP2010/073737		東京都千代田区大手町1丁目6番1号
(2) 国際出願日	平成22年12月28日 (2010.12.28)	(72) 発明者	金子 悦士 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和発酵キリン株式会社 ハイオ医薬研究所内
(3) 優先権主張番号	特願2009-296706 (P2009-296706)		佐々木 由香 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和発酵キリン株式会社 本社内
(3) 優先日	平成21年12月28日 (2009.12.28)	(72) 発明者	森 勝弘 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和発酵キリン株式会社 本社内
(3) 優先権主張国	日本国 (JP)		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗 I g A 1 抗体