

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-541259

(P2009-541259A)

(43) 公表日 平成21年11月26日(2009.11.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07H 15/04 (2006.01)</b>	C07H 15/04	E 4C057
<b>G01N 33/531 (2006.01)</b>	G01N 33/531	A 4C076
<b>G01N 33/574 (2006.01)</b>	G01N 33/574	B 4C085
<b>A61K 39/00 (2006.01)</b>	A61K 39/00	H 4H045
<b>A61K 47/48 (2006.01)</b>	A61K 47/48	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 23 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-515859 (P2009-515859)	(71) 出願人	504448162 ブラッコ・イメージング・ソシエタ・ベル ・アチオニ BRACCO IMAGING S. P. A. イタリア、イー20134ミラノ、ヴィア ・エジディオ・フォッリ50番
(86) (22) 出願日	平成19年6月19日 (2007.6.19)	(74) 代理人	100068526 弁理士 田村 恭生
(85) 翻訳文提出日	平成21年2月19日 (2009.2.19)	(74) 代理人	100100158 弁理士 鮫島 睦
(86) 国際出願番号	PCT/EP2007/056081	(74) 代理人	100138900 弁理士 新田 昌宏
(87) 国際公開番号	W02007/147823		
(87) 国際公開日	平成19年12月27日 (2007.12.27)		
(31) 優先権主張番号	60/815, 158		
(32) 優先日	平成18年6月20日 (2006.6.20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	06127025.2		
(32) 優先日	平成18年12月22日 (2006.12.22)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 糖抗原に対する特異抗体の製造方法

## (57) 【要約】

本発明は、抗体の産生を刺激するのに有用な新規化合物に関する。該化合物は、糖腫瘍抗原および高分子足場を含む。本発明は、糖抗原に対する抗体を選択するためのELISAアッセイに有用なコンジュゲート化合物も含む。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

カチオン化ウシ血清アルブミン(cBSA)、アルギネート、またはデキストランからなる群から選ばれる高分子足場と直接またはあらゆる適切なリンカーを介して結合している複数のTnまたはTF抗原を含む化合物。

## 【請求項2】

高分子足場がcBSAである請求項1記載の化合物。

## 【請求項3】

抗原が高分子足場と直接連結している請求項1記載の化合物。

## 【請求項4】

抗原があらゆる適切なリンカーを介して高分子足場と結合している請求項1記載の化合物。

10

## 【請求項5】

リンカーが直鎖または分岐鎖の合成または天然アミノ酸およびその誘導体、適切なペプチド、および炭化水素からなる群から選ばれる請求項4記載の化合物。

## 【請求項6】

該アミノ酸または炭化水素リンカーが2~10個の炭素原子を含む請求項5記載の化合物。

## 【請求項7】

複数のTn抗原がcBSAと直接結合している請求項1記載の化合物。

## 【請求項8】

医薬として用いるための請求項1~7のいずれかに記載の化合物。

20

## 【請求項9】

腫瘍に対するワクチンの製造における請求項8記載の使用。

## 【請求項10】

有効量の請求項1~7に記載のいずれかの化合物を適切な溶媒および1またはそれ以上の医薬的に許容される賦形剤とともに含む医薬組成物。

## 【請求項11】

有効量の請求項1~7の化合物またはそのあらゆる医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む腫瘍の治療方法。

## 【請求項12】

1) 高分子足場のいずれかを適切な緩衝水性溶液に溶解し、  
2) 工程(1)の溶液に、縮合剤ならびに適切な量のTnまたはTF抗原(これらはそれぞれ縮合剤の存在下で適切なリンカーと結合していることがある)を加え、  
3) 工程(2)から得られる溶液を適切な時間混合および攪拌して得られた生成物を回収する工程を含む、請求項1~7のいずれかに記載の化合物の製造方法。

30

## 【請求項13】

1) BALB/cマウスを免疫し、  
2) 動物を屠殺し、脾臓を切除し、  
3) 体細胞ハイブリダイゼーション(融合)により抗体産生細胞を不死化し、  
4) HAT培養液中でハイブリッド細胞を選択し、  
5) ELISAアッセイによりスクリーニングして最も特異的なクローンを得、  
6) サブクロニングする

40

(ここで、工程(1)は請求項1~7のいずれかに記載の化合物を注射することを含み、該抗原はそれぞれTnまたはTFである。)

工程を含む抗Tn抗体または抗TF抗体の製造方法。

## 【請求項14】

ビオチン化アルギネートと直接またはあらゆる適切なリンカーを介して結合している複数のTnまたはTF抗原を含む化合物。

## 【請求項15】

ビオチン化アルギネートがTnまたはTF抗原と直接結合している請求項14記載の化合物。

50

## 【請求項 16】

- 1) 緩衝溶液にアルギネートを溶解し、
  - 2) 先に得られた溶液に適切な量のビオチンまたはビオチン化剤を加え、
  - 3) 工程(2)から得られる溶液に、それぞれ直鎖または分岐鎖の合成または天然アミノ酸およびその誘導体、適切なペプチド、および炭化水素からなる群から選ばれる適切なリンカーと結合していることがある適切な量のTnまたはTF抗原を加え、
  - 4) 得られる溶液を適切な時間混合および攪拌して得られた生成物を回収する
- 工程を含む請求項14または15のいずれかのコンジュゲート化合物の製造方法。

## 【請求項 17】

抗Tnまたは抗TF抗原を選択するための請求項14または15に記載のコンジュゲート化合物の使用。

10

## 【請求項 18】

- 1) マイクロタイターウェルプレートにストレプトアビジンでコートし、
- 2) 工程1)から得られた固相に請求項14または15に記載のコンジュゲート化合物を固定化する工程を含む抗Tnまたは抗TF抗体を選択するためのELISA試験。

## 【請求項 19】

請求項13に従って製造される、および/または請求項18に従って選択される抗体。

## 【請求項 20】

さらに治療的または診断的部分で機能化された請求項19記載の抗体。

## 【発明の詳細な説明】

20

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、免疫診断および免疫療法の分野に用途があり、より詳細には、腫瘍関連炭化水素抗原に対する抗体の製造に有用な化合物に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

炭化水素は、種々の生物学的および生理学的経路に重要な役割を果たすことが知られている。実際に、炭化水素は、タンパク質の安定性または分解に対する抵抗性、細胞内情報伝達および膜または細胞小器官に対する糖タンパク質の標的化の調節に寄与し、免疫学的認識に関与することが解ってきた[一般的参考文献として、Varki, A.; *Glycobiology* 1993, 3, 97-130, Bertozzi, C.L., Kiessling, L.L.; *Science* 2001, 291, 2357-64, Angeloni, S.; *Glycobiology* 2005, 15(1), 31-41)参照のこと]。

30

## 【0003】

それに加え、種々の研究および研究プロジェクトが炭化水素およびその誘導体、例えばグリカンも細胞の腫瘍性修飾に関与することを発見している。実際に[Hakomori, S.; *Montreuil, J., Vliegenthart, J.F.G., Schachter, H.*(編) *Glycoproteins and disease*. Elsevier, Amsterdam, 1996の第4章、またはKobata A.; *Cancer cells and metastasis*. Montreuil, J., Vliegenthart, J.F.G., Schachter, H.(編) *Glycoproteins and disease*. Elsevier, Amsterdam, 1996の第3章、またはKumamoto et al in *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998, 247, 514-7、またはHakomori, S.; *PNAS* 2002, 99(16), 10231-33に記載されているように]、細胞膜に存在することが知られているグリカンは、通常、構造修飾を示す、例えば癌細胞膜において正常細胞膜より高度に分岐鎖化することが観察されている。

40

## 【0004】

同様に、あらゆる構造修飾に加え、正常細胞に対する膜炭化水素の組成変化も観察されている。

## 【0005】

腫瘍過程に役割を果たす糖部分のさらなる例として、例えばシアル酸(*The Merck Index*; XIII版; No.8558参照のこと)があり、9-炭素原子アミノ糖がノイラミン酸関連化合物のメンバーである。実際に、ある種の腫瘍型の高転移活性は細胞膜のシアル酸の濃度増加と

50

高い相関があり、転移現象における細胞外マトリックス細胞の付着能の低下を生じ得ることが観察されている(参考文献として、Varki, A. et al Essentials of glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1999参照のこと)。

【 0 0 0 6 】

さらに、例えばSames, D. et al in Nature 1997, 389, 587-91、またはDwek, M.V. et al.(Clinica Chimica Acta 1998, 271, 191-202)、またはBurchell et al(Glycobiology 1999, 9(12), 1307-11)、またはTaylor-Papadimitriou et al. (Biochim. Biophys. Acta 1999, 1455, 301-13)、またはHanisch et al(Glycobiology 2000, 10(5), 439-49)、またはSchuman, J. et al(Glycoconjugate Journal 2000, 17, 835-48)報告されているように、複雑な糖化合物の中で、多数のO-グリコシド残基を示し、上皮表面上の保護層をもたらす、細胞-細胞相互作用、情報伝達、および転移に關与する高度にグリコシル化された糖タンパク質(例えば変性MUC1)(参考文献としてParry S, Silverman HS et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001; 11; 283(3): 715-20参照のこと)は、腫瘍細胞の転移可能性に寄与するようである。

10

【 0 0 0 7 】

多くの分子変化が腫瘍の各1つの発生および進行期と關連があることが解ってきたが、それらの間の正確な関係はまだ完全には理解されていない。

【 0 0 0 8 】

腫瘍形成を特徴づけることが解った糖類の表現型変化は、一般的に腫瘍關連炭化水素抗原(以降、略してTACAという)としても知られている。

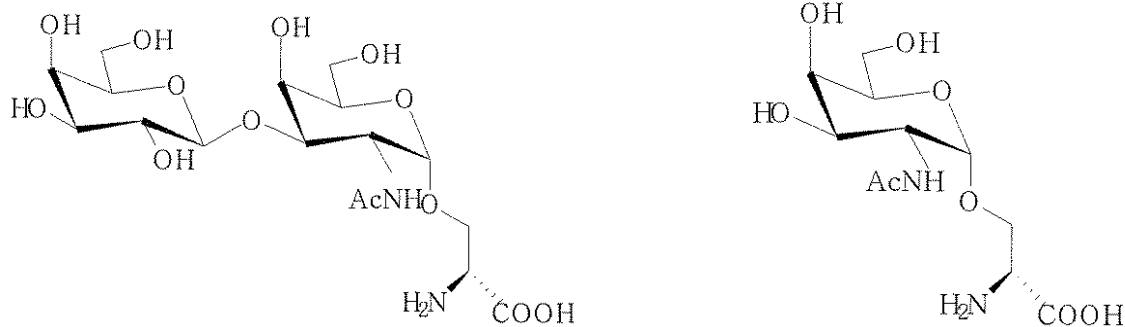
20

【 0 0 0 9 】

エピトープGal-β-1→3-GalNAc-α-O.Ser/ThrおよびGalNAc-α-O.Ser/Thr(下記化学構造参照のこと)(一般にそれぞれTFおよびTnという)は最も広く知られたTACAである。

【 0 0 1 0 】

【化1】



30

TF抗原(Gal-β-1→3-GalNAc-α-O.Ser/Thr)

Tn抗原(GalNAc-α-O.Ser/Thr)

【 0 0 1 1 】

上記で報告された式由来であるTn抗原決定基(immunodeterminant group)は、セリンまたはトレオニンのヒドロキシル基と結合したGalNAc残基であり、これは糖タンパク質のアミノ末端領域にみられる。次に、Gal-β-1→3-GalNAc-α-O.Ser/Thr(TF抗原)は、Gal-β-1→3-ガラクトース残基をTn残基に付加する酵素β-ガラクトシルトランスフェラーゼの作用により形成される。正常組織におけるこれら抗原の出現が、病的組織に対する特異性を検証するために検討された(例えば、Cao, Histochem.Cell Biol.1996, 106, 197-207参照のこと)。

40

【 0 0 1 2 】

さらに、TFおよびTn抗原は、かなりの程度、腫瘍組織の約90%に(参考文献としてSpringer, G.F.; Science 1984, 224, 1198-206参照のこと)免疫反応形で過剰発現することがわかり、ヒトの癌における相対比はしばしば癌の進行性それ自身と相関する。

50

## 【0013】

種々の研究結果は、転移過程の初期にTFおよびTn抗原がともに腫瘍細胞とその近くの正常細胞の間の付着現象に重要な役割を果たすことも示唆された(参考文献としてKischikawa et al., Jpn. J. Cancer Res. 1999, 90, 326-32参照のこと)。

## 【0014】

癌細胞に特異的に過剰発現した炭化水素抗原、すなわち、TFおよびTnの単離および構造的同定は、腫瘍性疾患の治療および診断(炭化水素に基づく免疫療法および免疫診断)のための戦略を開発するための最初の工程である(例えば、Allen in J. Am. Chem. Soc., 2001, 123, 1890-7参照のこと)。

## 【0015】

免疫療法は、有害物質、例えば微生物、汚染物質、化学物質、食物などに対する自然の身体の防御、すなわち免疫系の刺激に關与することが当該分野でよく知られている。したがって、膜上のTACAの発現変化を特徴とする癌細胞はヒトまたは動物の免疫系の標的であるかもしれないと予想される。例えばTnまたはTF抗原のような適切な腫瘍抗原を介する免疫系の刺激は腫瘍に対する有望な治療的手段でありうることがわかった。

## 【0016】

Toyokuni et al.(参考文献としてBioorg. Med. Chem. 1994, 2, 119-32参照のこと)は、さらに、ヒツジ血清アルブミン、Starbust(登録商標)デンドリマーおよびトリパルミトイル-S-グリセリルシステイニルセリン(P<sub>3</sub>CS)とコンジュゲートしたモノマー、ダイマー、およびトリマーTn抗原の使用による完全合成炭化水素ワクチンの製造について記載している。Lo-Man et al.(例えば、J. Immunol. 2001, 166, 2849-54参照のこと)は、4つの腕を有する樹状リジンコアに基づく多抗原性糖ペプチドと呼ばれる完全合成免疫原の開発を開示している。

## 【0017】

Kuduk et al.(参考文献として、J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 12474-12485参照のこと)は、TnおよびTF抗原のクラスター形成のためのKLH、BSA、およびリポペプチド(pam)の使用を記載しているが、Dziadek et al.(Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 7624-7630)は、TACAおよびBSAならびにMUC1ペプチドを含む化合物を製造するための同様のアプローチを開示している。

## 【0018】

Kagan et al.(参考文献として、Cancer Immunol. Immunother. 2005, 54, 424-430参照のこと)は、種々のTnコンジュゲート:Tn単糖、三重トレオニン骨格上に作成されたTn(c)、および部分的または完全グリコシル化MUC1骨格上に作成されたTnを用いて行った試験について記載している。

## 【0019】

しかしながら、上記の報告されたコンジュゲート化合物の主な制限は、それらをワクチンとして用いると、低品質の目的とする抗体の生成をもたらし、その特定の混合物が最終的に回収されるということである(例えば、Grigalevicius et al, Bioconjugate Chemistry, 2005, 16, 1149-1159参照のこと)。

## 【0020】

本発明者らは、腫瘍の治療にワクチンとして用いることができるTFおよびTn抗原の新規コンジュゲート化合物をみいだした。さらに、本発明のコンジュゲート化合物は、先行技術のTACAコンジュゲート化合物の上記欠点を克服することができる。

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0021】

したがって、本発明の第1の目的は、カチオン化ウシ血清アルブミン(cBSA)、アルギネート、またはデキストランからなる群から選ばれる高分子足場と直接またはあらゆる適切なリンカーを介して結合した複数のTnまたはTF抗原を含む化合物である。

## 【0022】

本明細書では特記しない限り、用語高分子足場は、高分子構造を有するcBSA、アルギネート、またはデキストランのようなあらゆる上記の足場を意味する。本発明の範囲内である高分子足場には、アスパラギン酸またはグルタミン酸残基にアルキルアミノ基を導入することにより修飾することができる免疫原性の高いタンパク質であるウシ血清アルブミン(BSA)がある(すなわち、カチオン化ウシ血清アルブミン(cBSA)が得られる)。本発明によれば、cBSAの分子量は約65~77KDaである。cBSAおよびその製造法の一般的参考文献については、例えばDomen et al. J. Immunol. 1987, 139,(10), 3195-8参照のこと。アルギネートは、異なる分子量の多糖鎖の混合物である(例えば、The Merck Index, XIII版、No. 239参照のこと)。

【0023】

典型的には、本発明によれば、アルギネートの分子量は、約130,000~約170,000、より好ましくは約140,000~約160,000の範囲でありうる。

【0024】

最後に、デキストランの一般的参考文献については、例えばThe Merck Index, XIII版、No. 2965参照のこと。

【0025】

本発明の好ましいコンジュゲート化合物はcBSAおよびアルギネートを含み、より好ましくはcBSAを含む。

【0026】

先に報告されているように、上記高分子足場は、複数のTnまたはTF抗原と、共有結合を介して直接、または適切なリンカーにより結合している。

【0027】

適切なリンカーの例には、例えば、適切なペプチドまたは炭化水素を含む直鎖または分岐鎖の合成または天然アミノ酸およびその誘導体が含まれ、他の同様のリンカーも当業者の知識内にある。

【0028】

より好ましくは、該アミノ酸またはペプチドは2~約10個の炭素原子を含みうる。

【0029】

本発明の好ましい態様によれば、コンジュゲート化合物は、選択した足場と直接結合した上記抗原を含む。

【0030】

構造式が上記で報告されているTnおよびTF抗原の両方に関する限り、それらは、カルボキシアミド結合を介して、すなわちそのアミノまたはカルボキシ基のいずれかを介して該部分の残り(例えば足場)と結合している。

【0031】

用語「複数のTnまたはTF抗原」は、特記しない限り、2以上の該抗原が高分子足場と直接または適切なリンカーを介して結合していることを意図する。

【0032】

典型的には、本発明のコンジュゲート化合物内の高分子支持体と結合した抗原の数は、高分子足場それ自身を形成し、適切な反応性官能基(例えばアミノ、カルボキシ)を保持する単量体単位の数、ならびにコンジュゲート化合物の合成に採用された有効な実験条件でかなり異なりうる。

【0033】

特に、cBSAを含む本発明のコンジュゲート化合物の場合は、TnまたはTF抗原の約5~約30の部分、例えばTnまたはTF抗原の約10~約20の部分が各cBSA分子と結合しうる。

【0034】

同様に、アルギネートを含むコンジュゲート化合物の場合は、TnまたはTF抗原の約200~約250の部分、例えばTnまたはTF抗原の約220~約230の部分が各アルギネート分子と結合しうる。

【0035】

10

20

30

40

50

好ましい態様によれば、本発明は、複数のTn抗原と直接結合したcBSAを含むコンジュゲート化合物に言及する。

【0036】

別の好ましい態様によれば、本発明は複数のTn抗原と直接結合したアルギネートを含むコンジュゲート化合物に関する。

【0037】

本発明のさらなる目的は、以下の工程を含む、上記で報告したコンジュゲート化合物を製造するための方法を提供することである：

- 1) 高分子足場のいずれかを適切な緩衝水性溶液に溶解し、
- 2) 工程(1)の溶液に、縮合剤、および適切な量のTnまたはTF抗原(これらはそれぞれ縮合剤の存在下で適切なリンカーと結合していることがある)を加え、
- 3) 工程(2)から得られる溶液を適切な時間混合および攪拌して得られた生成物を回収する。

10

【0038】

上記工程およびそのあらゆる変形は、適切な水性緩衝液、例えば2-モルホリノ-エタンスルホン酸(MES)中、工程(1)の通りに行われ、適切な濃度は、例えば25mMであり、適切なpHは、約4.5~約7、好ましくは6.5である。

【0039】

工程(2)については、選択した抗原の量は、該抗原と足場が予期したモル比で反応し、本発明の目的とするコンジュゲート化合物が得られるものである。

20

【0040】

上記反応は、カルボキシアミド結合の形成において通常採用されるあらゆる適切な縮合剤の存在下で行われる。好ましくは、該縮合剤は、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)単独、または1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)との組み合わせである。

【0041】

上記縮合剤は、好ましくはわずかに化学量論的過剰で用いられる。

【0042】

上記から、該リンカーは存在するときはいつもそれが該足場と結合する前に選択した抗原とすでに結合(例えば接続)しているか、または最初に該足場と結合(例えば接続)し、次いで得られる中間体化合物を選択した抗原と結合させることができることが当業者に明らかである。

30

【0043】

この局面において、この所望の変形はともに本発明の範囲内である。

【0044】

さらに、抗原と足場がそれ自体でまたはあらゆる適切なリンカーにより、カルボキシアミド結合、例えば-CONH-または-NHCO-の形成を通して結合するので、抗原、足場、またはリンカーそれ自身のいずれかに存在することがある、望まない副産物を生じるような上記操作条件下で反応しやすいあらゆる他の反応基をよく知られた方法に従って適切に保護/脱保護する必要があることは当業者に明らかである。

40

【0045】

本発明によれば、工程(3)の最終産物の回収は、例えば診断および凍結乾燥を含む通常の方法で行われる。本発明の方法内およびそのあらゆる変形により、選択した抗原および足場を含むあらゆる出発物質ならびに反応物質(それらはそれぞれ所望によりリンカーと結合している)、および該リンカー自体はすべて知られた化合物であるか、またはそれらは当該分野で知られた通常の方法に従って製造することができる。

【0046】

本発明の化合物の置換度、すなわち各足場と結合したTnまたはTF抗原残基の数の決定は、知られた方法に従って行う。

【0047】

50

例として、cBSAを含む本発明の化合物の置換度の決定は、Acremonium sp.由来の酵素-N-アセチルガラクトサミニダーゼ[Seikagaku(Tokyo, Japan)]を使用説明書の実験条件に従って用いる酵素反応により行う。より詳細には、例えばTn抗原については、加水分解は、0.25 mlのTn抗原を含む基質混合物を0.05 mlの酵素(活性、約13U/ml)をクエン酸緩衝液中、pH4.5、37℃で2時間インキュベートすることにより行われる。次に、0.2Mホウ酸緩衝液(pH9.8)を加えて反応を止める。得られる糖残基、すなわちTn抗原由来のN-アセチルガラクトサミン(GalNac)の定量は、材料と方法の項に記載のキャピラリー電気泳動によって行う。同様に、アルギネートまたはデキストランを含む本発明化合物の置換度は、コンジュゲート化合物の凍結乾燥試料を用いて行う自動元素分析により測定される。次に、置換度、すなわち、各足場と結合したTnまたはTF抗原の数の測定結果(実施例の項の実施例3および4参照のこと)をパーセンテージで表現する。したがって、例えば15%の置換度のアルギネートは、アルギネートの100反復単糖単位の15個がTnまたはTF抗原の1分子と結合していることを意味する。

10

20

30

40

50

**【0048】**

先に報告したように、本発明のコンジュゲート化合物は治療および予防に応用することができ、より詳細には癌のワクチンとして用いることができる。

**【0049】**

したがって、本発明のさらなる目的は、一般的医薬的実務のごとく、複数のTnまたはTF抗原がカチオン化ウシ血清アルブミン(cBSA)、アルギネート、またはデキストランからなる群から選ばれる高分子足場と直接またはあらゆる適切なリンカーを介して結合しているコンジュゲート化合物を医薬的に許容される賦形剤(溶媒、担体、緩衝剤、安定化剤などを含む)と共に含む医薬組成物である。

**【0050】**

一般に、あらゆる適切な賦形剤は本発明の医薬組成物に適切に含まれてよく、その製造は当業者によく知られた一般的方法に従って達成することができよう。

**【0051】**

したがって、本発明のさらなる目的は、治療または予防に用いるための、カチオン化ウシ血清アルブミン(cBSA)、アルギネート、またはデキストランからなる群から選ばれる高分子足場と直接または適切なリンカーを介して結合した複数のTnまたはTF抗原を含む化合物である。

**【0052】**

さらに、本発明のさらなる目的は、複数のTFまたはTn抗原がカチオン化ウシ血清アルブミン(cBSA)、アルギネート、またはデキストランからなる群から選ばれる高分子足場と直接または適切なリンカーを介して結合している本発明の適切な量のコンジュゲート化合物、またはそのあらゆる医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む、腫瘍の治療または予防方法である。

**【0053】**

意図した目的のための本発明のコンジュゲート化合物の適切な量は、抗原およびその誘導体の投与を含む治療または予防目的に典型的に用いられる量であり、選択した適切な治療プロトコルに従って決定することができる。

**【0054】**

したがって、本発明のさらなる目的は、腫瘍を治療または予防するための医薬またはワクチンの製造における、カチオン化ウシ血清アルブミン(cBSA)、アルギネート、またはデキストランからなる群から選ばれる高分子足場と直接または適切なリンカーを介して結合した複数のTnまたはTF抗原を含む化合物の使用である。

**【0055】**

さらなる態様によれば、本発明のコンジュゲート化合物は、TnまたはTF抗原に対する特異抗体の製造に用いることもできる。

**【0056】**

典型的には、前記抗体はモノクローナル抗体(以後、mAbという)の製造に用いるよく知

られた方法により製造することができる。

【0057】

本発明のための動物を用いる実験には単にmAbを製造するのに用いた正常マウスも含めた。動物は、国家規制により確立された動物管理基準に従って動物施設に収容し、承認された当局のプロトコールのもとに個々の研究施設の指針に従って維持した。また、動物は獣医師が定期的に検査し、承認された動物施設内の資格のある動物管理者が取り扱った。

【0058】

モノクローナル抗体を製造するための一般的参考文献は、例えばKoehler, G., Milstein, C.; Nature 1975, 256, 495-7参照のこと。

【課題を解決するための手段】

【0059】

一例として、本発明の特定の抗体の製造方法は以下の工程を含む：

- 1) BALB/cマウスを免疫し、
- 2) 動物を屠殺し、脾臓を切除し、
- 3) 体細胞ハイブリダイゼーション(融合)により抗体産生細胞を不死化し、
- 4) HAT培養液中でハイブリッド細胞を選択し、
- 5) ELISAアッセイによりスクリーニングして最も特異的なクローンを得、次いで
- 6) サブクローニングする。

【0060】

工程(1)による免疫は、本発明のコンジュゲート化合物の注射により行う。好ましくは、該コンジュゲート化合物は、複数のTn抗原がcBSAと直接結合したものである。

【0061】

工程2)、3)、4)、および6)は、既知の方法に従って行う。

【0062】

詳細には、本発明では工程(5)に関する限り、酵素免疫測定法(ELISAとしてよりよく知られている)は、本発明の足場と結合した時に免疫に使用するものに対応する選択したTnまたはTF抗原が適切に固定化される固相の使用を含む。

【0063】

より詳細には、高分子足場は、ストレプトアビジン/ビオチン結合により固体支持体上に結合/固定化することができるビオチン化高分子足場である。ELISAは、タンパク質、抗体、およびホルモンなどの物質を検出および定量するためのよく知られたアッセイである。ELISAの第1工程は、ELISAプレート上に特異抗原を固定化する必要があり、次に、本発明に従って選択する抗体を含む試料を固相に加え、次いで、固定化抗原と相補的抗体の複合体が形成されるようにインキュベーションする。次に、洗浄して非結合物質を除去する。さらなる工程には、適切な酵素と結合させた、形成された複合体に対する第二抗体の添加を含む(最も一般的に用いられる酵素はホースラディッシュペーパーオキシダーゼ(HRP)およびアルカリホスファターゼ(AP)である)。最後に、例として、次に適切な色原体を加え、固定化抗原と結合した抗体の量(この後者の変動を評価する場合は試料中に存在する抗体の量)に応じて色強度の変動を生じるであろう。

【0064】

本発明におけるELISA技術に対する一般的参考文献については下記実験の項を参照のこと。

【0065】

詳細には、ELISAのための固相上への選択した抗原の固定化は本発明のビオチン化コンジュゲート化合物を固定化することにより好都合に行うことができる。これに関して、抗原-ビオチン化アルギネートコンジュゲートの固定化は、本発明のあらゆるコンジュゲート化合物それ自身の接種により生じる抗体を検出するのに特に選択的であることがわかった。すなわち、本発明の選択したコンジュゲート化合物(例えばTnとcBSAのコンジュゲート)をマウスに適切に接種し、免疫および抗体製造する際には、ELISA試験は、そのように生成された抗体を含む試料を、本発明のビオチン化コンジュゲート化合物、好ましくは該

10

20

30

40

50

TACA(すなわちTn抗原)とのビオチン化アルギネートコンジュゲートを含む固相に加えることにより好都合に行うことができる。

【0066】

上記から、同様の考慮事項をTF抗原およびそのコンジュゲート化合物についても適用することができることは当業者に明らかである。

【0067】

したがって、本発明の別の目的は、ビオチン化アルギネート、ビオチン化カチオン化ウシ血清アルブミン(ビオチン化cBSA)、またはビオチン化デキストランからなる群から選ばれるビオチン化高分子足場を直接またはあらゆる適切なリンカーを介して結合した複数のTnまたはTF抗原を含む化合物である。

10

【0068】

好ましくは、ビオチン化高分子足場はビオチン化アルギネートである。

【0069】

この点において、cBSA、アルギネート、およびデキストランは、先に報告したように定義される。

【0070】

同様に、本発明のビオチン化足場と結合したTnまたはTF抗原の数は先に定義した通りである。

【0071】

ビオチン(The Merck Index, XIII版、No.1231参照のこと)は、タンパク質またはポリペプチドとのカルボキシル化反応に役割を果たすことが知られている天然の成長因子である。

20

【0072】

ビオチンは、特に固体ベッドのin vitro調製に用いられるストレプトアビジンと選択的に結合するので、ビオチンは分離および精製技術において該固相上に固定化される分子と有効に結合することができる。

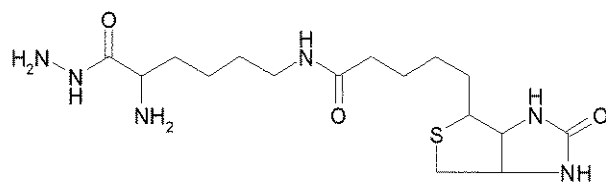
【0073】

ビオチン誘導体の中でN-(+)-ビオチニル-L-リジンヒドラジドは高分子足場のビオチン化に有効に用いることができる。特に、それは以下に示す化学構造を有する市販化合物である。

30

【0074】

【化2】



N-ε-(+)-ビオチニル-L-リジンヒドラジド

40

【0075】

ビオチンのポリマー、すなわち、cBSA、アルギネート、またはデキストランとの結合は、これら高分子化合物のあらゆるカルボキシ基を介して無作為に生じる。

【0076】

高分子足場がビオチン化高分子足場である本発明のコンジュゲート化合物の製造では、該方法は以下の工程を含む：

- 1) 適切な緩衝水性溶液中に高分子足場のいずれかを溶解し、
- 2) 適切な縮合剤の存在下で、工程(1)の溶液に、適切な量のビオチンまたはビオチン化剤

50

を加え、

3) 工程(2)から得られる溶液に、適切な縮合剤、および適切な量の選択されたTnまたはTF抗原(それらはそれぞれ適切なリンカーと結合していることがある)を加え、

4) 工程(3)から得られる溶液を適切な時間混合および攪拌して得られる生成物を回収する。

【0077】

上記方法では、目的のビオチン化ポリマーを得るための適切な量のビオチンまたはビオチン化剤は当業者の知識内である。

【0078】

しかしながら、本発明の方法に用いる操作条件に対する具体的参考文献およびその詳細については下記実験の項参照のこと。

10

【0079】

例えば、好ましい縮合剤は、単独またはEDCと組み合わせて用いるNHSである。したがって、本発明のさらなる目的は、TnまたはTFがそれぞれcBSA、アルギネート、またはデキストランと結合したTnまたはTF抗原である免疫技術を用いて生成された抗体を検出するためのELISA試験において、固相上に適切に固定化されたビオチン化アルギネート、ビオチン化cBSA、またはビオチン化デキストランと結合したTnまたはTF抗原を含むコンジュゲート化合物の使用である。

【0080】

本発明のある態様では、免疫技術を用いて生成された抗体のELISA試験による検出において、固相上に適切に固定化されたビオチン化アルギネートと結合したTnまたはTF抗原を含み、cBSA、アルギネート、またはデキストランと結合したTnまたはTF抗原を含む、コンジュゲート化合物を使用するのが特に好ましい。

20

【0081】

典型的には、特記しない限り、ビオチン化ポリマーと結合したTnまたはTF抗原の固相上への適切な固定化は、マイクロタイター-ELISAプレートウェルをストレプトアビジンでコーティングし、該ウェルを、選択したビオチン化ポリマーとTnまたはTFのコンジュゲートで満たし、次いで適切な時間インキュベーションすることが含まれよう。

【0082】

上記操作条件は当該分野でよく知られており、その詳細は実験の項に報告されている。

30

【0083】

そのように生成し、本発明に従って選択した抗体も治療的に用いることができる。

【0084】

さらに、該抗体は、特定の腫瘍部位または組織を選択的に標的化するため、既知の方法に従って診断的または治療的に活性な化合物を用いて適切に機能化することができる。

【0085】

実際に、該抗体は表面にTnおよび/またはTF抗原を発現する腫瘍細胞を選択的に攻撃し、結合するので、腫瘍部位または組織に治療的活性部分を提示するかまたは該部位または組織に可視化を可能にするための診断的部分を提示するための担体としても作用し得る。

【0086】

典型的には、治療的または診断的活性化合物による機能化は、該抗体を特定の抗腫瘍薬または当該分野で知られた検出可能な標識と反応させることを含み得る。

40

【0087】

上記から、該抗体および治療的または診断的活性部分は、直接にまたは当該分野で知られたあらゆる適切なリンカーまたはスペーサーを介して互いに結合し得ることは当業者に明らかである。

【0088】

これらのリンカーには、限定されるものではないが、当該分野で知られた置換または非置換のアルキル鎖、ポリエチレングリコール誘導体、アミノ酸スペーサー、糖、または脂肪族もしくは芳香族スペーサーが含まれ得る。

50

## 【 0 0 8 9 】

例えば、本発明の診断部分の適切な例には、磁気共鳴画像法(MRI)に適した常磁性金属キレート、X線画像法に適した放射性標識、超音波検出に適した超音波マイクロスフェアもしくはリポソーム、または光学画像染料が含まれる。

## 【 0 0 9 0 】

常磁性キレートの中で好ましい金属元素は、原子番号が20~31、39、42、43、44、49、および57~83の範囲のものである。より好ましくは、以下から選ばれる常磁性金属イオンである：Fe(2+)、Fe(3+)、Cu(2+)、Ni(2+)、Rh(2+)、Co(2+)、Cr(3+)、Gd(3+)、Eu(3+)、Dy(3+)、Tb(3+)、Pm(3+)、Nd(3+)、Tm(3+)、Ce(3+)、Y(3+)、Ho(3+)、Er(3+)、La(3+)、Yb(3+)、Mn(3+)、Mn(2+)。Gd(3+)が最も好ましい。有機キレート剤は、常磁性金属のリガンドおよび常磁性金属との複合体として働く1またはそれ以上の極性基を有する分子である。適切なキレート剤は当該分野で知られており、これにはメチレンホスホン酸基、メチレンカルボヒドロキサミン酸基、カルボキシエチリデン基、またはカルボキシメチレン基が含まれる。キレート剤の例には、限定されるものではないが、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)、1,4,7,10-テトラアザシクロテトラデカン-1,4,7,10-四酢酸(DOTA)、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、および1,4,8,11-テトラアザシクロテトラデカン-1,4,8,11-四酢酸(TETA)が含まれる。さらなるキレートリガンドは、エチレンビス-(2-ヒドロキシフェニルグリシン)(EHPG)、およびその誘導体(5-Cl-EHPG、5Br-EHPG、5-Me-EHPG、5t-Bu-EHPG、および5sec-Bu-EHPGを含む)、ベンゾジエチレントリアミン五酢酸(ベンゾ-DTPA)およびその誘導体(ジベンゾ-DTPA、フェニル-DTPA、ジフェニル-DTPA、ベンジル-DTPA、およびジベンジルDTPAを含む)、ビス-2-(ヒドロキシベンジル)-エチレン-ジアミン二酢酸(HBED)およびその誘導体、少なくとも3個、より好ましくは少なくとも6個の炭素原子、および少なくとも2個の異種原子(Oおよび/またはN)を含む大環状化合物のクラス(ここで、大環状化合物は異種環元素と一緒に結合した1個の環、または2または3個の環からなりうる)、例えば、ベンゾ-DOTA、ジベンゾ-DOTA、およびベンゾ-NOTA(ここで、NOTAは、1,4,7-トリアザシクロノナン-N,N',N''-三酢酸である)、ベンゾ-TETA、ベンゾ-DOTMA(ここで、DOTMAは1,4,7,10-テトラアザシクロテトラデカン-1,4,7,10-四(メチル四酢酸)、およびベンゾ-TETMA(ここで、TETMAは1,4,8,11-テトラアザシクロテトラデカン-1,4,8,11-(メチル四酢酸)；1,3-プロピレンジアミン四酢酸(PDTA)およびトリエチレントetraアミン六酢酸(TTHA)の誘導体；1,5,10-N,N',N''-トリス(2,3-ジヒドロキシベンゾイル)-トリカテコレート(LICAM)および1,3,5-N,N',N''-トリス(2,3-ジヒドロキシベンゾイル)アミノメチルベンゼン(MECAM)の誘導体、(4S)-4-(4-エトキシベンジル)-3,6,9-トリスカルボキシラトメチル)-3,6,9-トリアザウンデカン二酸-ニナトリウム(EOB-DTPA)、N,N-ビス[2-[ビス(カルボキシメチル)アミノ]エチル]-L-グルタミン酸(DTPA-GLU)、N,N-ビス[2-[ビス(カルボキシメチル)アミノ]エチル]-L-リジン(DTPA-LYS)、DTPAモノ-またはビス-アミド誘導体、例えばN,N-ビス[2-[カルボキシメチル[(メチルカルバモイル)メチル]-アミノ]エチル]グリシン(DTPA-BMA)、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7-三酢酸(DO3A)、10-(2-ヒドロキシプロピル)-1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7-三酢酸(HPDO3A)、4-カルボキシ-5,8,11-トリス(カルボキシメチル)-1-フェニル-2-オキサ-5,8,11-トリアザトリデカン-13-酸(BOPTA)、2-メチル-1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸(MCTA)、( , ' , '' , ''')-テトラメチル-1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸(DOTMA)、3,6,9,15-テトラアザピシクロ[9.3.1]ペンタデカ-1(15),11,13-トリエン-3,6,9-三酢酸(PCTA)、および6-[ビス(カルボキシメチル)アミノ]-テトラヒドロ-6-メチル-1H-1,4-ジアゼピン-1,4(5H)-二酢酸(AAZTA)およびその誘導体が含まれる(国際特許出願WO3/008390(この内容は本明細書の一部を構成する)に記載されている)。

## 【 0 0 9 1 】

本発明により予期される典型的キレート剤およびキレート基の例は、WO 98/18496、WO 86/06605、WO 91/03200、WO 95/28179、WO 96/23526、WO 97/36619、PCT/US98/01473、PCT/US98/20182、およびU.S.4,899,755に記載されている(これらの内容は本明細書の一部を構成する)。

10

20

30

40

50

## 【0092】

上記化合物、具体的には診断的応用を意図したもの、より具体的にはMRIに用いるものは、すべて当該分野で知られた通常の方法に従って製造することができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0093】

【図1】モノクローナル抗体の製造技術を示す。

【図2】ビオチン化アルギネート-Tnコンジュゲート化合物(Alg-Tn)を用いて試験したTn-cBSA免疫後のマウス「#1」およびマウス「#2」血清のELISA結果を示す。アルギネート(Alg)およびTn抗原(Tn)を基準に用いた。

【図3】Tnハイブリドーマ選択の例を示す。グラフに、ビオチン化アルギネート-Tnコンジュゲート化合物を用いて試験したクローン上清の吸光度値を示す。

10

## 【0094】

以下の実施例で本発明をより詳細に開示する。他の同様の応用も、明示的に含まれていなくても本発明の範囲内にあるものとみなす。

実験の項材料と方法

## 【0095】

N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、N-アセチルガラクトサミン、2-アミノ安息香酸(2-AA)、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、およびビオチンはSigma Chemical Co.(St. Louis、MO)から、N<sup>-</sup>(+)-ビオチニル-L-リシンヒドラジド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)および2-モルホリノエタンスルホン酸(MES)一水和物はFluka(Buchs、Switzerland)から、Acremonium sp.由来-N-アセチルガラクトサミニダーゼはSeikagaku(Tokyo、Japan)から得た。PBS(リン酸緩衝生理食塩水；Cambrex Bio Science、Verviers、Belgium)、Tween 20(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)、オボアルブミン(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO) ABTSパーオキシダーゼ基質(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)、抗マウスIgG-パーオキシダーゼ(コンジュゲート)(Amersham Biosciences、Freiburg、Germany)、ストレプトアビジン(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)。

20

キャピラリー電気泳動

## 【0096】

高速キャピラリー電気泳動システムは、HP Chemstationソフトウェアと共にHewlett-Packard(Agilent、Waldbronn、Germany)、Model HP3DCEから得た。GalNAc(標準、またはBSA-Tnの加水分解から生じる)の2-AAによる誘導体化は、糖の水性溶液と誘導体化溶液(0.25M 2-AA、0.159Mシアノ水素化ホウ素ナトリウム；99%メタノールおよび1%酢酸中)を混合することにより行った。溶液を60℃で5時間加熱した。キャピラリー電気泳動分析の前に、試料を水で5回希釈した。分析条件は表Aに示す。各操作の前に、キャピラリーの洗浄操作を水酸化ナトリウム(2 min、985 mbar)および作業用緩衝液(4 min、985 mbar)を用いて行った。

30

HPLC-UV

## 【0097】

カラム	Synergy Polar(4.6 x 250 mm ; 5 μm)(Agilentから)
カラム温度	RTまたは45°C(詳細はテキスト参照のこと)
移動相	溶離剤A : CH <sub>3</sub> OH 溶離剤B : 5 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> pH3.5
溶出プロフィール	0-8' : 3%A, 97%D ; 13' : 40%A, 60%B, 20' : 90%A, 10%B ; 38' : 90%A, 10%B ; 45' : 3%A, 97%B
流速	1mL/min
注射容量	10 μL
PDA検出装置による検出	操作時間 : 30分間
	スキャン波長 : 190-800nm
	チャンネルA : 195nm

10

表1 : HPLC-UVの実験条件

機器 : L-6200. ポンプ、AS-200Aオートサンプラー、およびL-4500Aダイオードアレイ検出器を備えたHPLC-UV Merck-Hitachi。データの獲得と分析は、D-700クロマトグラフィデータステーションソフトウェア(Merck-Hitachi)により行った。

## HPLC-MS

## 【 0 0 9 8 】

20

カラム	Synergi Polar - RP 80A(2.0 x 250 mm ; 4 μm)(Phenomenexから)
カラム温度	45°C
移動相	溶離剤A : CH <sub>3</sub> OH 溶離剤B : 5mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> pH3.5
溶出プロフィール	0-8' : 3%A, 97%D ; 13' : 40%A, 60%B, 20' : 90%A, 10%B ; 38' : 90%A, 10%B ; 45' : 3%A, 97%B
流速	200 μL/min
注射容量	10 μL
PDA検出器で検出	操作時間 : 45min
	スキャン波長 : 200~500nm
	チャンネルA : 195nm
MS検出器で検出	操作時間 : 45min
	ESI電圧 : 5kV
	極性 : 正
	キャピラリー温度 : 250°C
	シースガス性状および流量 : N <sub>2</sub> , 60単位
	補助ガス性状および流量 : 使用せず
	キャピラリー電圧 : 46V
	チューブレンズオフセット : 55V
	質量範囲 : 50~2000

30

40

表2 : HPLC-MSの実験条件

機器 : MSポンプ、オートサンプラー、およびPDA検出器を装備したHPLC SURVEYOR Thermo Finniganシステムをエレクトロスプレーオン化(ESI)LCQ DECA XP Plus Thermo Finnigan質量分析器と併用。Xcaliburソフトウェアを用いてシステムおよびデータを管理した。

## 【 実施例 】

## 【 0 0 9 9 】

50

実施例1

## cBSA-Tnコンジュゲート化合物の製造

Tn抗原(1mg)およびcBSA(2mg)をMES緩衝液含有溶液(0.2M)、pH6に溶解し、EDCおよびNHSをわずかに化学量論的過剰に加え、次いで混合物を2時間攪拌した。次に、溶液を透析し、凍結乾燥し、標記化合物を回収した。

## 【0100】

同様の処理により、本発明のあらゆる適切な抗原およびあらゆる高分子足場を用いて以下の化合物を得ることができる：

- アルギネート-Tnコンジュゲート化合物；
- デキストラン-Tnコンジュゲート化合物；
- cBSA-TFコンジュゲート化合物；
- アルギネート-TFコンジュゲート化合物；
- デキストラン-TFコンジュゲート化合物。

10

実施例2

## ビオチン化アルギネート-Tnコンジュゲート化合物の製造

## 1) アルギネートのビオチン化

## 【0101】

Laminaria hyperboreanから単離したアルギネートをProtan A/S(Norway)から得、イソプロパノール中で沈殿させて精製した。30mg(0.15mmol-反復ユニット)のアルギネートを10mLのMES緩衝液(0.2M)、pH6に溶解した。次に、EDCおよびNHSをわずかに化学量論的過剰で加え、次に、N- (+)-ビオチニル-L-リジンヒドラジド(3.2mg)を加えて溶液を6~8時間攪拌し、次いで透析し、凍結乾燥した。

20

## 【0102】

同様の処理により、本発明のあらゆる適切な高分子足場およびあらゆる適切なビオチン化部分を用いてビオチン化cBSAおよびビオチン化デキストランを得ることができる。

## 2) ビオチン化アルギネートのTnによる誘導体化

## 【0103】

14mg(0.071mmol)のビオチン化アルギネートを5.0mLの0.2M MES緩衝液、pH6.0に溶解した。可溶化後にEDC(33.9mg)およびNHS(4.7mg)、および10分間後に0.6mg( $1.95 \times 10^{-3}$ mmol、0.027eq)の -GalNAc- -O-Serを加えた。溶液を8時間攪拌し、透析し、次いで凍結乾燥して標記化合物を回収した。

30

## 【0104】

同様の処理により、工程(1)においてあらゆるビオチン化足場を用いて出発し、該ビオチン化足場をTF抗原と結合/誘導体化することもできる。

実施例3

## 実施例1のコンジュゲート化合物の置換度の検出

## 【0105】

適用した実験条件は、先に明細書に記載したように酵素の供給業者が示したものである。

## 【0106】

先の実施例1の化合物のモル置換度は3%であった。

40

実施例4

## 実施例2のコンジュゲート化合物の置換度の測定

## 【0107】

高分子足場としてアルギネートまたはデキストランを含む本発明のコンジュゲート化合物の置換度の測定は元素分析により行う。

## 【0108】

先の実施例2の化合物のモル置換度は15%であった。

実施例5

## 抗Tnおよび抗TF抗体の製造および選択

50

## 【0109】

抗Tnおよび抗TF抗体を本発明の説明に記載の好ましい方法に従って製造し、これを以下に示す。

- 1) 2匹の8週齢の雌BALB/cマウスにRibi's(MPL(登録商標)+TDM Adjuvant System; Sigma)で適切にエマルジョン化したTn-cBSA 200 µgを3回腹腔内注射して免疫し、免疫応答を観察した。次に、PBSで適切に希釈した選択したコンジュゲート化合物20 µgをさらに3回静脈内注射した。
- 2) 動物を屠殺し、脾臓を切除した。
- 3) 抗体産生細胞を体細胞ハイブリダイゼーション(融合)により不死化した。
- 4) ハイブリッド細胞をHAT培養液で選択した。
- 5) ELISA試験を行って最も特異的なクローンを得た。
- 6) サブクロニングを行った。

10

## 【0110】

上記方法の工程2)、3)、4)、および6)は既知の方法に従って行った(先の発明の説明の記載を参照のこと)。

## 【0111】

工程5)は、下記実施例6に開示した方法に従って行った。

実施例6

## 抗体の選択

## 【0112】

発明の説明に記載の方法に従ったELISA試験を以下のごとく行った：

- マイクロタイタープレートのウェルを炭酸緩衝液(100mM、pH9,6)中の10 µg/mlストレプトアビジンで4、一夜コートした。
- PBSで洗浄した後、ウェルに100 µg/mlのTn-ビオチン化アルギネートコンジュゲートを満たし、37 で1時間インキュベートした。
- PBSによる洗浄を室温で3回行った。
- PBSオボアルブミン1%溶液で37、1時間ブロックした。
- PBSによる洗浄を室温で3回行った。
- マウス血清ハイブリドーマ上清をウェルに加え、37 で1時間インキュベートした。
- PBS Tween0,02%溶液で3回洗浄した。
- 抗マウスIgG-HRP結合第二抗体を加え、室温で1時間インキュベートした。
- PBS Tween0,02%溶液で、室温で3回洗浄した。
- 0,5mg/ml ABTSパーオキシダーゼ基質を加えた。
- ELISAプレート上に結合した抗原を405nmで比色定量した。

20

30

【 図 1 】

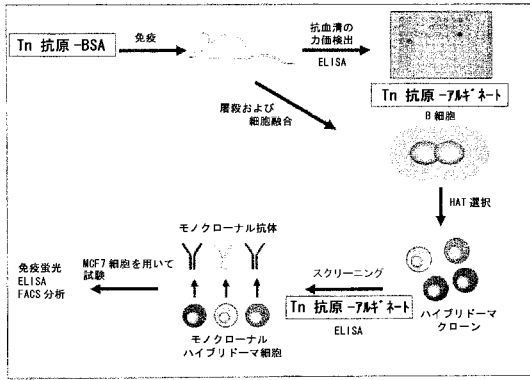


FIG. 1

【 図 2 】

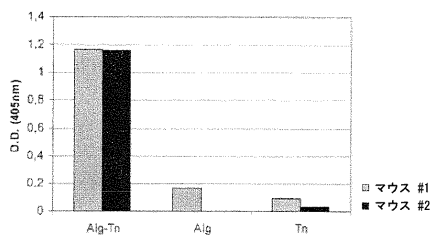


FIG. 2

【 図 3 】

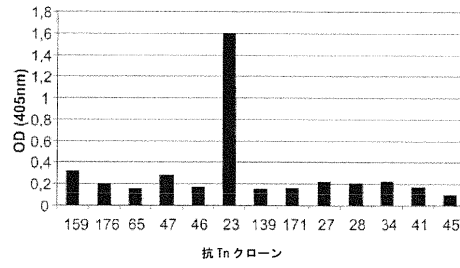


FIG. 3

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/EP2007/056081
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/385 C07K16/30 G01N33/543 G01N33/68		
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) A61K C07K G01N		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	S. KUDUK ET AL.: "Synthetic and immunological studies on clustered modes of mucin-related Tn and TF O-linked antigens: The preparation of a glycopeptide-based vaccine for clinical trials against prostate cancer." JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 120, 1998, pages 12474-12485, XP002956518 U.S.A. cited in the application abstract	1-13, 19, 20
Y	----- -/-	14-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 document 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  21 August 2007		Date of mailing of the international search report  06/09/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Palantjean 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Nooij, Frans

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2007/056081

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	T. TOYOKUNI ET AL.: "Synthetic carbohydrate vaccines: Synthesis and immunogenicity of Tn antigen conjugates." BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 2, no. 11, 1994, pages 1119-1132, XP000938458 U.K. cited in the application abstract page 1123, right-hand column, last paragraph - page 1125, left-hand column, paragraph 1	1-13, 19, 20
A	E. KAGAN ET AL.: "Comparison of antigen constructs and carrier molecules for augmenting the immunogenicity of the monosaccharide epithelial cancer antigen Tn." CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, vol. 54, no. 5, May 2005 (2005-05), pages 424-430, XP019333116 Germany cited in the application abstract	1-13, 19, 20
A	P. DOMEN ET AL.: "Cationization of protein antigens. III. Abrogation of oral tolerance." THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 139, no. 10, 15 November 1987 (1987-11-15), pages 3195-3198, XP002447216 U.S.A. cited in the application abstract page 3198, left-hand column, last paragraph	1-7, 12, 13
A	H. KUNZ ET AL.: "Synthesis of glycopeptides with the TN and T antigen structures, and their coupling to bovine serum albumin." CARBOHYDRATE RESEARCH, vol. 202, 1990, pages 207-223, XP002447217 abstract	1-7
A	K. DAHLENBORG ET AL.: "Human monoclonal antibodies specific for the tumour associated Thomsen-Friedenreich antigen." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 70, no. 1, 6 January 1997 (1997-01-06), pages 63-71, XP002447218 U.S.A. abstract	13, 19

-/--

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/EP2007/056081

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99/58978 A (THE UNIVERSITY OF NOTTINGHAM) 18 November 1999 (1999-11-18) examples 5,8  -----	14-18

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2007/056081

**Box 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.: 11 (partially)  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although present claim 11 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
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 dependant claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box 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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/056081

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9958978	A	18-11-1999	
		AT 314651 T	15-01-2006
		AU 3838899 A	29-11-1999
		DE 69929185 T2	31-08-2006
		DK 1078264 T3	15-05-2006
		EP 1078264 A2	28-02-2001
		ES 2257048 T3	16-07-2006
		PT 1078264 T	31-05-2006

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>C 0 7 K 16/18 (2006.01)</b>	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 14/765 (2006.01)	C 0 7 K 14/765	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 フルヴィオ・ウッジェーリ  
イタリア、イ - 2 0 1 3 4 ミラノ、ヴィア・エジディオ・フォッリ 5 0 番、ブラッコ・イメージング・ソシエタ・ペル・アチオニ

(72) 発明者 クリスティアーナ・カンパ  
イタリア、イ - 3 4 0 1 2 トリエステ、キロ・メトゥロ 1 6 3 . 5、エッセエッセ 1 4、エディフィチオ・ケ、アエッレエア・サイエンス・パーク、ブラッコ・イメージング・ソシエタ・ペル・アチオニ - チエッレエンメ・トリエステ

(72) 発明者 セルジョ・パオレッティ  
イタリア、イ - 3 4 1 2 7 トリエステ、ヴィア・エッレ・ジョルジエーリ 1 番、デッレ・マクロモレコーレ、ピオフィシカ・エ・キミカ、ディパルティメント・ディ・ピオキミカ、ウニヴェルシタ・デッリ・ストゥーディ・ディ・トリエステ

(72) 発明者 アンナ・コスローヴィ  
イタリア、イ - 3 4 1 2 7 トリエステ、デッレ・マクロモレコーレ、ピオフィシカ・エ・キミカ、ディパルティメント・ディ・ピオキミカ、ウニヴェルシタ・デッリ・ストゥーディ・ディ・トリエステ

(72) 発明者 アルフォンソ・コロンバッチ  
イタリア、イ - 3 3 1 0 0 ウーディネ、ピアッツァーレ・コルベ 4、セントロ・ディ・エッチェルレンツァ・エンメアティイ、ディパルティメント・ディ・シエンツェ・エ・テクノロジー・ピオメディケ、ウニヴェルシタ・デッリ・ストゥーディ・ディ・ウーディネ

(72) 発明者 カルラ・ダヌッシ  
イタリア、イ - 3 3 1 0 0 ウーディネ、ピアッツァーレ・コルベ 4、セントロ・ディ・エッチェルレンツァ・エンメアティイ、ディパルティメント・ディ・シエンツェ・エ・テクノロジー・ピオメディケ、ウニヴェルシタ・デッリ・ストゥーディ・ディ・ウーディネ

F ターム(参考) 4C057 BB02 BB03 CC01 DD01 JJ09  
4C076 CC27 EE36 EE38 EE41 EE59 FF02  
4C085 AA03 BB50 CC33  
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20 EA31 EA50 FA71 FA74

专利名称(译)	产生针对糖抗原的特异性抗体的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009541259A</a>	公开(公告)日	2009-11-26
申请号	JP2009515859	申请日	2007-06-19
[标]申请(专利权)人(译)	伯拉考成像股份公司		
申请(专利权)人(译)	布拉科成像Soshietta佩尔 - Achioni		
[标]发明人	フルヴィオウツジェーリ クリスティアーナカンパ セルジョパオレッティ アンナコスローヴィ アルフォンソコロンパッティ カルラダヌッシ		
发明人	フルヴィオウツジェーリ クリスティアーナカンパ セルジョパオレッティ アンナコスローヴィ アルフォンソコロンパッティ カルラダヌッシ		
IPC分类号	C07H15/04 G01N33/531 G01N33/574 A61K39/00 A61K47/48 A61P35/00 C07K16/18 C07K14/765		
CPC分类号	A61K39/385 A61K2039/6081 A61K2039/6087 A61P35/00 C07K16/3076 G01N33/574 G01N2400/00		
FI分类号	C07H15/04.E G01N33/531.A G01N33/574.B A61K39/00.H A61K47/48 A61P35/00 C07K16/18 C07K14/765		
F-TERM分类号	4C057/BB02 4C057/BB03 4C057/CC01 4C057/DD01 4C057/JJ09 4C076/CC27 4C076/EE36 4C076/EE38 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF02 4C085/AA03 4C085/BB50 4C085/CC33 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA74		
代理人(译)	新田正弘		
优先权	60/815158 2006-06-20 US 2006127025 2006-12-22 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及用于刺激抗体产生的新化合物。该化合物包括糖肿瘤抗原和聚合物支架。本发明还包括可用于ELISA测定的缀合化合物，用于选择抗糖抗原的抗体。

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)		
<b>C07H</b>	<b>15/04</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 H	15/04	E	4 C O 5 7
<b>G01N</b>	<b>33/531</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N	33/531	A	4 C O 7 6
<b>G01N</b>	<b>33/574</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N	33/574	B	4 C O 8 5
<b>A61K</b>	<b>39/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	39/00	H	4 H O 4 5
<b>A61K</b>	<b>47/48</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	47/48		
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 23 頁) 最終頁に続く						

(21) 出願番号	特願2009-515859 (P2009-515859)	(71) 出願人	504448162
(86) (22) 出願日	平成19年6月19日 (2007.6.19)		ブラッコ・イメージング・ソシエタ・バル
(85) 翻訳文提出日	平成21年2月19日 (2009.2.19)		・アチオニ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2007/056081		BRACCO IMAGING S. P.
(87) 国際公開番号	W02007/147823		A.
(87) 国際公開日	平成19年12月27日 (2007.12.27)		イタリア、イー20134ミラノ、ヴィア
(31) 優先権主張番号	60/815, 158		・エジディオ・フォッリ50番
(32) 優先日	平成18年6月20日 (2006.6.20)	(74) 代理人	100068526
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 田村 崇生
(31) 優先権主張番号	06127025.2	(74) 代理人	100100158
(32) 優先日	平成18年12月22日 (2006.12.22)		弁理士 殿島 睦
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100138900
			弁理士 新田 昌宏

最終頁に続く