

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2014 年 11 月 6 日(06.11.2014)



(10) 国際公開番号  
**WO 2014/178196 A1**

- (51) 国際特許分類:  
*C07K 16/18* (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01) *G01N 33/577* (2006.01)  
*C12N 5/10* (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/002402
- (22) 国際出願日: 2014 年 5 月 2 日(02.05.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2013-096866 2013 年 5 月 2 日(02.05.2013) JP
- (71) 出願人: 独立行政法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 奥田 徹哉(OKUDA, Tetsuya); 〒0628517 北海道札幌市豊平区月寒東 2 条 1 7 丁目 2 番 1 号独立行政法人産業技術総合研究所北海道センター内 Hokkaido (JP).
- (74) 代理人: 佐伯 憲生, 外(SAEKI, Norio et al.); 〒1030027 東京都中央区日本橋三丁目 1 5 番 8 号 アミノ酸会館ビル 4 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))  
— 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13 の 2.4(d)(i) 及び 48.2(a)(viii))

(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODY RECOGNIZING SIALYLATED SUGAR CHAINS

(54) 発明の名称: シアリル化糖鎖を認識するモノクローナル抗体

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a novel monoclonal antibody having high affinity and that strictly recognizes, as a sugar chain epitope, only a "Sia $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc(6'-Sialyl-LacNAc): CDw75" sugar chain structure, being a molecular target for diagnosis of the malignancy of tumors. An anti-CDw75 monoclonal antibody is provided that recognizes "CDw75" sugar chain structures but does not recognize similar sugar chain structures indicated by "Gal $\beta$ 1,4GlcNAc", "Sia $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc", or "Sia $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4Glc", by using a glycolipid antigen bonding a carrier lipid compound "HOCH<sub>2</sub>CH(NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>22</sub>-CH<sub>3</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>-CH<sub>3</sub>(C12L)" developed by the inventors to a "CDw75" sugar chain. The obtained anti-CDw75 monoclonal antibody is an excellent detection drug for B-cell lymphoma, gastric cancer, or colorectal cancer, an excellent diagnostic agent for tumor malignancy, etc., an excellent treatment agent for B-cell lymphoma, gastric cancer, or colorectal cancer, and an excellent prevention/treatment drug for influenza.

(57) 要約: 腫瘍の悪性度診断などの分子標的となる糖鎖構造「Sia $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc (6'-Sialyl-LacNAc): CDw75」のみを厳密に糖鎖エпитープとして認識でき、かつ親和性も高い新規モノクローナル抗体を提供すること。「CDw75」糖鎖に、本発明者らの開発したキャリア脂質化合物「HOCH<sub>2</sub>CH(NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>22</sub>-CH<sub>3</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>-CH<sub>3</sub>(C12L)」を結合した糖脂質抗原を免疫誘導剤として用いることで、「CDw75」の糖鎖構造を認識するが、類似した「Gal $\beta$ 1,4GlcNAc」、「Sia $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc」及び「Sia $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4Glc」で表される糖鎖構造は認識しない、特異性及び親和性の高い抗 CDw75 モノクローナル抗体を提供した。得られた抗 CDw75 モノクローナル抗体は、優れた B 細胞性腫瘍、胃癌又は大腸癌の検出薬、腫瘍悪性度等の診断剤や、B 細胞性腫瘍、胃癌又は大腸癌の治療薬、インフルエンザの予防、治療薬となる。

WO 2014/178196 A1

## 明 細 書

発明の名称：シアリル化糖鎖を認識するモノクローナル抗体

### 技術分野

[0001] 本発明は、シアリル糖鎖の「6' -Sialyl-LacNAc (Sia $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc) : CDw75」を特異的に認識する高親和性モノクローナル抗体、並びに当該モノクローナル抗体を用いた胃癌又は大腸癌の検出、診断及び治療用組成物、インフルエンザ用予防及び治療用組成物などに関する。また、当該モノクローナル抗体を用いたELISA法やウエスタンブロット法による糖鎖解析用キットに関する。

### 背景技術

[0002] 哺乳動物細胞には、細胞の種類、発生・分化段階、病態などを反映し、それぞれに特徴的な構造の糖鎖が発現している。糖鎖は糖タンパク質や糖脂質のような形態で細胞表層や血清中に存在しており、その性質からタンパク質、核酸と同様にバイオマーカーとしての有効活用が検討されている。近年では、糖鎖が生体内にて重要な機能を有することもわかってきており、その機能に関する研究も進められている。例えば、シアリル化糖鎖の「Sia $\alpha$ 2,6Gal」、又は「Sia $\alpha$ 2,3Gal」は、免疫応答に関与するリンパ球表面に広く存在する糖鎖であるため、これらのシアリル化糖鎖の検出薬剤は免疫不全の指標として用いられている（特許文献1）。

しかしながら、糖鎖の構造同定や検出に関する技術は、タンパク質や核酸と比べて十分に確立されていない。糖鎖の構造のうち、その構造を特徴づける部分構造を識別し検出できる抗体が開発できれば、各種の悪性腫瘍や各種病態の速やかで正確な診断や治療剤の開発にとって大きな福音となるばかりでなく、タンパク質解析に汎用されるELISA法やウエスタンブロット法等による簡便な糖鎖解析が可能となり、糖鎖機能や産業応用に関する研究開発も加速すると考えられる。

[0003] N-結合型糖タンパク質のオリゴ糖鎖のうち「6' -Sialyl-LacNAc (Sia $\alpha$ 2,6

Gal $\beta$ 1,4GlcNAc)」で表される糖鎖構造は、「CDw75」とも称されており、哺乳動物細胞に発現する糖タンパク質や糖脂質に見られる構造である。この糖鎖構造は、ヒトインフルエンザウィルスが感染受容体とすることで知られ（非特許文献1）、またB細胞性腫瘍の細胞表層マーカーとして（非特許文献2）、更には胃癌や大腸癌の悪性度と相関性のある新規腫瘍マーカー（CDw75）のエピトープとして同定されている（非特許文献3）。このような重大疾病との関連性から、診断指標としての有効活用が検討されており、特に、胃癌や大腸癌の悪性度の判定などの診断や、B細胞性腫瘍などの悪性腫瘍治療の分子標的として期待が大きい。

CDw75は、リンパ球を免疫して得られた4種類のモノクローナル抗体により共通認識される細胞表層抗原として定義された抗原であり（非特許文献4）、成熟B細胞や末梢血中のT細胞の一部に発現する。もともとの4種類の抗体が共通認識する部分エピトープとして、Sia $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAcで表される糖鎖抗原が同定され、これがCDw75の実体であることが明らかとなった（非特許文献3）が、その一方でこれらの4種類の抗体の特異性が異なることも知られている。それぞれの抗体は、CDw75及びその近傍の領域までエピトープに含み、CDw75を有する異なる生体分子を認識すると考えられる。上記4種類の抗体のうち、最も汎用されている抗体はLN-1モノクローナル抗体であって市販もされているが（Santacruz Biotechnology社）、CDw75に対する親和性及び特異性の不十分さ故に、その用途は免疫組織化学的検査に限定されている（非特許文献3）。

オリゴ糖鎖を抗原にする場合、哺乳動物の体内における糖鎖を認識する免疫システムは発達が不十分であるため、オリゴ糖鎖自身をエピトープとして認識する抗体の産生は一般に難しい。微生物由来の糖鎖は比較的認識されやすいが、哺乳動物由来の糖タンパク質の糖鎖抗原、とりわけN-結合型糖鎖に含まれるオリゴ糖鎖抗原を認識する抗体の産生は難しいことが知られており（非特許文献5、非特許文献6）、現在に至っても、糖タンパク質のN-結合型糖オリゴ糖鎖抗原自身をエピトープとする有効な抗体はほとんど開発され

ていないのが実情である。

CDw75をエピトープとして認識する抗体については、ホスファチジルエタノールアミンをキャリア化合物として、そのアミノ基にCDw75を含むオリゴ糖鎖を還元的に結合させた化合物を免疫原とし免疫を誘導する方法により得られたCDw75モノクローナル抗体（非特許文献6）が報告されている。しかし、得られたCDw75モノクローナル抗体の親和性、特異性は十分ではなく、実用性に乏しい。

以上のように、CDw75糖鎖に対しては、診断薬として、また治療のための分子標的としての期待が大きいにもかかわらず、現在までに、CDw75そのものをエピトープとする親和性、特異性の高い実用的な抗体は存在していない。このような経緯から、CDw75をダイレクトに正確に検出可能な実用的な抗体の開発が望まれている。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0004] 特許文献1：特表2002-528037号公報

### 非特許文献

[0005] 非特許文献1：Suzuki Y. (2005) Biol. Pharm. Bull. 28, 399-408.

非特許文献2：Guy K. and Andrew JM. (1991) Immunology, 74, 206-214.

非特許文献3：Costa-Nogueira C., et al. (2009) BMC Cancer. 9, 431.

非特許文献4：Bast BJ., et al. (1992) J. Cell Biol. 116, 423-435.

非特許文献5：Ozawa H., et al. (1997) Arch. Biochem. Biophys. 342, 48-57.

非特許文献6：Murakami D., et al. (2008) Arch. Biochem. Biophys. 477, 299-304.

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、腫瘍悪性度の診断や、悪性腫瘍治療、インフルエンザ治療など

の分子標的となる糖鎖構造「 $\text{Sia}\alpha 2,6\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}(6' -\text{Sialyl-LacNAc})$  : CDw75」のみを厳密に糖鎖エпитープとして認識でき、かつ親和性も高い新規モノクローナル抗体を提供するものであり、同時に、タンパク質解析の汎用法であるウエスタンブロット法に応用可能なモノクローナル抗体を提供する。

また、本発明は、当該モノクローナル抗体を用いたB細胞性腫瘍、胃癌又は大腸癌の診断方法及び診断用キット、さらには悪性度の高い腫瘍治療剤のスクリーニング方法を提供する。

### 課題を解決するための手段

[0007] 発明者らは、任意のオリゴ糖鎖の免疫原性を増強させることが可能なキャリア化合物の開発に成功しており、その技術を応用することで目的とするオリゴ糖鎖と開発したキャリア化合物からなる免疫誘導剤を開発し、同日付で特許出願している。

本発明においては、標的オリゴ糖鎖「 $6' -\text{Sialyl-LacNAc}(\text{Sia}\alpha 2,6\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc})$  : CDw75」に対して、当該免疫誘導方法を適用し、常法通りモノクローナル抗体を作製した。

その結果、標的オリゴ糖鎖（ $6' -\text{Sialyl-LacNAc}$ ）をエпитープとして認識するが、前駆体であるLacNAc（ $\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}$ ）及び哺乳動物体内に存在する糖鎖のうち目的オリゴ糖鎖と最も構造が近似する $3' -\text{Sialyl-LacNAc}(\text{Sia}\alpha 2,3\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc})$ 及び $6' -\text{Sialyllactose}(\text{Sia}\alpha 2,6\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc})$ はいずれも認識しないという、きわめて特異性の高いモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を選別できた。また、CDw75にて修飾された糖タンパク質（Fetuin）に対する解離定数からみてその親和性も非常に高いことが確認できた。

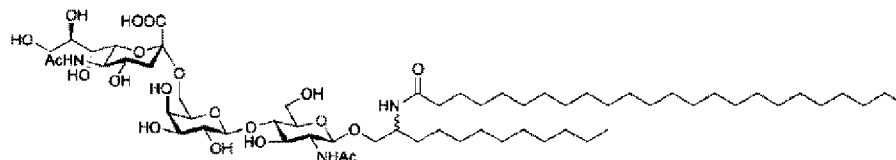
[0008] 即ち、本発明は以下の発明を包含する。

[1]  $\text{Sia}\alpha 2,6\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}$ で表される糖鎖構造CDw75を認識するが、 $\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Sia}\alpha 2,3\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}$ 及び $6' -\text{Sialyllactose}(\text{Sia}\alpha 2,6\text{Gal}\beta 1,4\text{Glc})$ で表される糖鎖構造は認識しない、抗CDw75モノクローナル抗体

又はそのフラグメント。

〔２〕 下記一般式（２）で表される糖脂質抗原CDw75-C12Lを免疫原として得られる、前記〔１〕に記載の抗CDw75モノクローナル抗体又はそのフラグメント。

[0009] [化1]



・・・一般式（２）

[0010] 〔３〕 ハイブリドーマFR9（受託番号NITE BP-01516）により産生される、前記〔１〕又は〔２〕に記載の抗CDw75モノクローナル抗体又はそのフラグメント。

〔４〕 前記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の抗CDw75モノクローナル抗体又はそのフラグメントと、薬学的に許容される担体を含む組成物。

〔５〕 前記〔４〕に記載の組成物であって、B細胞性腫瘍、胃癌又は大腸癌の抑制及び／又は治療のための医薬組成物。

〔６〕 前記〔４〕に記載の組成物であって、インフルエンザの予防及び／又は治療のための医薬組成物。

〔７〕 前記〔４〕に記載の組成物であって、B細胞性腫瘍、胃癌又は大腸癌に対する検出用及び／又は診断用組成物。

〔８〕 前記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の抗CDw75モノクローナル抗体又はそのフラグメントを用いることを特徴とする、糖鎖抗原CDw75の検出及び／又は定量方法。

〔９〕 前記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の抗CDw75モノクローナル抗体又はそのフラグメントを有効成分とする、胃癌又は大腸癌の罹患及び／又は腫瘍悪性度判定用キット。

〔１０〕 前記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の抗CDw75モノクローナル抗体又はそのフラグメントを用いることを特徴とする、糖鎖抗原CDw75を有する

化合物の精製方法。

〔11〕 前記〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の抗CDw75モノクローナル抗体又はそのフラグメントを用いることを特徴とする、糖鎖抗原CDw75を有する細胞の単離方法。

〔12〕 抗CDw75モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマFR9（受託番号NITE BP-01516）。

## 発明の効果

[0011] 本発明で得られたモノクローナル抗体は、「CDw75」糖鎖構造に対して厳密なエпитープ認識特異性を有しており、その親和性も極めて高いことから、当該モノクローナル抗体は、B細胞性腫瘍、胃癌及び大腸癌診断のための有効なツールとなり、また、悪性度の高い腫瘍治療剤のスクリーニングにも有効に用いることができる。

さらに、その際に、細胞及び組織レベルでの検出、解析法であるフローサイトメトリーや免疫組織化学での使用はもちろんのこと、タンパク質の解析に汎用されるウエスタンブロット法や、タンパク質分子レベルでの解析においても利用可能である。

特に、ウエスタンブロット法は、分子量や等電点によるタンパク質の分離検出が可能な簡易解析法であり、分析対象のタンパク質における当該糖鎖エпитープの存在を容易に判別することが可能となる。

また、本発明のモノクローナル抗体は、「CDw75」糖鎖構造をエпитープ認識するため、当該オリゴ糖鎖が含まれる物質であれば糖脂質、糖タンパク質を問わずどのようなものでも検出が可能である。この性質を応用して、糖タンパク質のコアタンパク質領域を認識する抗体と併用し、診断薬の基本技術であるサンドイッチELISAやイムノクロマト法に適用すれば、さらに感度の良い検出が可能である。

## 図面の簡単な説明

[0012] [図1]開発したモノクローナル抗体FR9のエпитープに対する親和性： A：FR9抗体のエпитープに対する親和性について、CDw75糖鎖を含む糖タンパク質

(Fetuin) を抗原とした解離定数 ( $K_d$  値) を ELISA 法及びスキャッチャードプロットにて決定した。x 軸に抗原抗体複合体量 ( $Ag-Ab$ ) を抗体総量 ( $Abt$ ) で除した値 ( $Ag-Ab/Abt$ )、y 軸には ( $Ag-Ab/Abt$ ) を遊離抗原総量 ( $Agf$ ) で除した値 ( $Ag-Ab/Abt \cdot Agf$ ) をプロットしてある。各プロットの近似曲線 ( $y = -0.11x + 0.11$ ) の傾きが  $-1/K_d$  となるため、その値より  $K_d$  値 ( $8.86 \times 10^{-7} M$ ) を算出した。B: FR9 抗体のエピトープに対する親和性について、CDw75 糖鎖を含む糖タンパク質 (Fetuin: 白丸) 及び免疫原 (CDw75-C12L) を抗原とした ELISA により、検出感度を測定した。

[図2]開発したモノクローナル抗体FR9のELISA法による特異性解析: FR9 抗体の抗原認識特異性について、表 1 に示す各種の糖鎖抗原化合物を用いた ELISA 法により解析した。

[図3]ウエスタンブロット法によるモノクローナル抗体FR9の特異性解析: FR9 抗体のウエスタンブロット法への適用性を評価した。左図は用いた Fetuin 糖タンパク質の CBB 染色像、右図はそのウエスタンブロット像。1: Fetuin 糖タンパク質、2: 全てのシアル酸を酵素分解した Fetuin 糖タンパク質 (Fetuin-a)、3:  $\alpha 2, 3$  結合型シアル酸のみを選択的に酵素分解した Fetuin 糖タンパク質 (Fetuin-b)。

[図4]競合阻害アッセイによるモノクローナル抗体FR9の特異性解析: FR9 抗体のシアリルラクトース ( $Sia \alpha 2, 6Gal \beta 1, 4Glc$ ) に対する親和性を競合阻害アッセイにて解析した。シアリルラクトース (白丸) 又は CDw75 オリゴ糖鎖 (黒丸) を競合剤として加え、その影響を ELISA 法にて評価した。x 軸には加えた競合剤の濃度、y 軸には FR9 抗体の結合量を示してある。

[図5]ウエスタンブロット法によるモノクローナル抗体FR9の特異性解析-2: FR9 抗体のウエスタンブロット法への適用性を評価した。左図は用いた  $\alpha 1$  ー酸性糖タンパク質 (AGP) の CBB 染色像、右図はそのウエスタンブロット像。1: AGP、2: 全てのシアル酸を酵素分解した AGP (AGP-a)、3:  $\alpha 2, 3$  結合型シアル酸のみを選択的に酵素分解した AGP (AGP-b)。

[図6]がん細胞 (B細胞性腫瘍細胞) 表層に発現する CDw75 の検出: FR9 抗体

を用いて、B細胞性腫瘍細胞（バーキットリンパ腫細胞株：Raji cell）の細胞表層に発現するCDw75を検出した。1：ネガティブコントロール、2：FR9抗体。

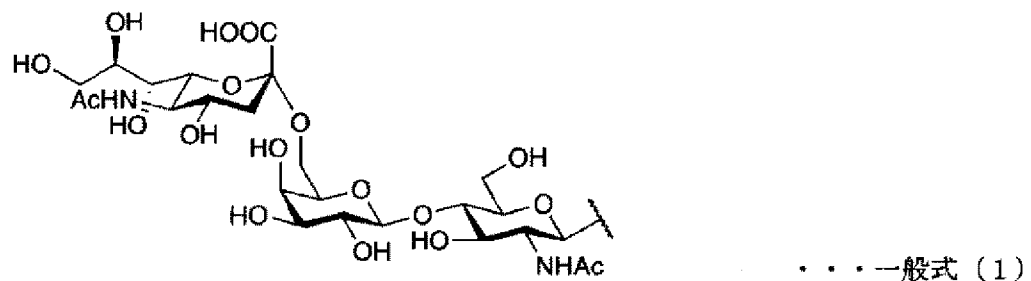
## 発明を実施するための形態

### [0013] 1. 本発明で用いた免疫原

(1-1) 本発明の標的オリゴ糖鎖「CDw75」について

本発明の標的オリゴ糖鎖「CDw75」の糖鎖構造は、  
「6'-Sialyl-LacNAc (Sia $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc)」の下記一般式(1)で表される。

### [0014] [化2]



[0015] 当該糖鎖が観察される天然の還元末端側には、タンパク質、脂質、糖などが結合しているが、本発明の抗「CDw75」抗体は、当該糖鎖のみを糖鎖エピトープとして認識している。

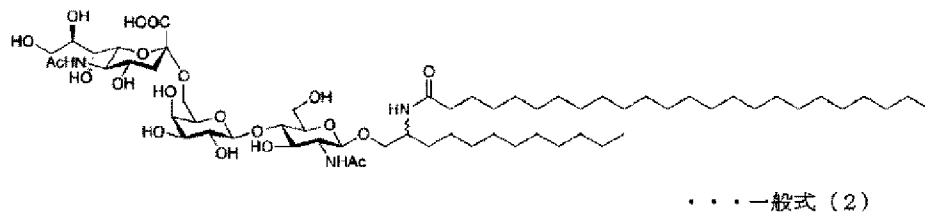
「CDw75」は、哺乳動物細胞で発現するシアリル化糖鎖の1種であり、B細胞性腫瘍、胃癌、大腸癌の悪性度判定の診断指標となる腫瘍マーカー（CDw75）として、また悪性腫瘍治療の分子標的として注目される。

### [0016] (1-2) 糖脂質抗原（キャリア脂質化合物による免疫誘導）

本発明の「CDw75」糖鎖抗原として、本発明者らの開発したキャリア脂質化合物「HOCH<sub>2</sub>CH(NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>22</sub>-CH<sub>3</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>-CH<sub>3</sub>」（C12L）を結合した糖脂質抗原である下記一般式(2)で表される「CDw75-C12L」を用いている。

### [0017]

[化3]



## [0018] (1-3) 糖脂質抗原「CDw75-C12L」の製造法

オリゴ糖鎖「CDw75」に対してキャリア化合物の「C12L」を結合させる方法としては、「CDw75」の還元末端側に付加されている水酸基以外の水酸基を保護した状態で、その-OH基をハロゲン基などの活性基にしておいた「C12L」とを縮合反応させることで、「CDw75」の構造を維持したままコンジュゲートできる。

その他に、例えば以下の方法で製造することができる。

まず、N-アセチル-グルコサミンから誘導される糖供与体(例えば、3,4,6-トリ-O-アセチル-2-デオキシ-2-(4,5-ジクロロフタルイミド)-D-グルコピラノシル ブロミド)と受容体となる2-アジドアルキルアルコール $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}(\text{N}_3)\text{CH}_2\text{OH}$ をグリコシル化反応によりカップリングさせた後、ヒドロキシ基の脱保護反応、側鎖アジド基の還元反応などを行い、アミノ基を有したグルコサミン誘導体 $\text{GlcNAc-CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$ を合成する。

この化合物に $\beta$ 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ 2,6-シアリルトランスフェラーゼを用いた酵素反応に供しシアリル3糖体へと誘導した後、その側鎖アミノ基と脂肪酸(リグノセリン酸)をアミド化反応により縮合し、CDw75-C12Lを合成する。

## [0019] 2. 本発明のモノクローナル抗体について

本発明のモノクローナル抗体というとき、「CDw75」糖鎖とキャリア脂質(C12L)とを結合した糖脂質抗原を用いて免疫することで得られるモノクローナル抗体をいう。

本発明のモノクローナル抗体は、「CDw75」糖鎖構造のみを糖鎖エピトープ

として認識する抗体であり、極めて特異性及び親和性が高いため、抗体全体ではなく、その断片(例えば、Fab又はF(ab')<sub>2</sub>断片)であっても十分に機能する。したがって、本発明のモノクローナル抗体というとき、「CDw75」糖鎖認識能を有するその機能的フラグメントも意味する。両者を、「抗CDw75モノクローナル抗体又はそのフラグメント」ということもある。

また、本発明のモノクローナル抗体は、ヒト型抗体又はヒト抗体であってもよい。ヒト型抗体は、例えば、マウス-ヒトキメラ抗体であれば、本発明のモノクローナル抗体を産生するマウス細胞から抗体遺伝子を単離し、そのH鎖定常部をヒトイムノグロブリン H鎖定常部遺伝子に組換え、マウス骨髓腫細胞に導入することにより調製できる。また、ヒト抗体は、免疫系をヒトと入れ換えたマウスに「CDw75」糖鎖とキャリア脂質(C12L)とを結合した糖脂質抗原を免疫することにより調製することが可能である。

[0020] 本発明のモノクローナル抗体は、以下のように表現できる。

「CDw75 (Sia $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc)」の糖鎖構造を認識し、「LacNAc (Gal $\beta$ 1,4GlcNAc)」、「3'-Sialyl-LacNAc (Sia $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc)」、及び「6'-Sialyllactose (Sia $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4Glc)」の糖鎖構造を認識しない、抗CDw75モノクローナル抗体。

ここで、本発明の抗CDw75モノクローナル抗体は、任意のタンパク質、脂質、糖、糖タンパク質、糖脂質等のオリゴ糖が結合可能な化合物、細胞又は基板、固定化用担体に結合して用いてもよい。

なお、本発明で「基板」というとき、糖鎖アレイ用に広く用いられる基板、又は精製用のビーズを指し、ポリスチレン、PVDF、ガラス等が用いられる。ビーズは、磁気ビーズであってもよい。基板表面は、疎水性と親水性が混在する分子と高い親和性を有するよう処理が施されていることが好ましい。また、「固定化用担体」としては、アフィニティカラムなどとして利用可能な、アガロース、デキストラン、セルロース、スターチ、ポリアクリルアミド等のゲル材が好ましい。

[0021] 3. 本発明のモノクローナル抗体の製造方法

### (3-1) 免疫方法及びハイブリドーマのスクリーニング方法

本発明のモノクローナル抗体の製造法は当該分野で周知の常法が適用できる（例えばShepherd P. and Dean C., *Monoclonal Antibodies*, Oxford University Press, 2000など）。

具体的には、「CDw75」糖鎖に対して、本発明者らが開発したキャリア脂質化合物（C12L）を結合した人工糖脂質抗原（CDw75-C12L）を、免疫誘導剤として非ヒト哺乳動物、例えばラット、マウス、ウサギなど、好ましくはマウスに常法通り免疫する。例えば、アジュバント（Lipid-A）と共にコレステロール、リン脂質、などの脂質に溶解して作製したリポソームを静脈注射するリポソーム法（Brodinらの方法；*Eur. J. Immunol.*, 16, 951-956, 1986）などが好適に用いられる。

融合糖鎖抗原の動物1匹当たりの投与量は、アジュバント利用下にて0.05～0.2 mgである。アジュバントとしては、酸で処理した*Salmonella minnesota strain R595*、完全フロイントアジュバンド等を用いることができるが、Lipid-Aを含むリポソーム法が好ましい。その際に、追加免疫を行うこともできる。免疫は、主として静脈内、皮下、腹腔内に注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは2～5週間間隔で、1～10回、好ましくは3～6回免疫を行う。そして、最終の免疫日から1～7日後、好ましくは2～3日後に抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞等が挙げられるが、脾臓細胞又は局所リンパ節細胞が好ましい。

### [0022] (3-2) ハイブリドーマの選択方法

常法により、脾臓細胞をミエローマ細胞と融合し、IL-6の存在下で胸腺フィーダー細胞と一緒に培地中でインキュベートした後、IMDM培地のHATにより選択する。次いで、増殖するクローンの上清を「CDw75」糖鎖を用いてスクリーニングするが、その際に、免疫組織化学分析などを用いてもよいが、基板上に固定した「CDw75」糖鎖に対して、酵素免疫測定法（ELISAなど）又はウエスタンブロットによる簡便なスクリーニング法が適用できる。ここで、「C

Dw75」糖鎖抗体産生ハイブリドーマの選択に、ELISA法又はウェスタンブロット法が適用できることも本発明のメリットである。

本発明では、好ましくは培養上清中の抗体価はELISA法により評価し、抗体価を指標としてハイブリドーマを選別する。抗体価は、例えば、二次抗体として用いた抗マウスイムノグロブリン抗体の標識酵素であるペルオキシダーゼの活性として評価する。ペルオキシダーゼの発色基質にはTMBを用い、反応後に2規定の硫酸を加えた後の450nmの吸光度の強度を評価する。

まず、免疫原とした糖脂質抗原「CDw75-C12L」及びCDw75 (6' -Sialyl-LacNAc) 糖鎖構造を含有する糖タンパク質 (Fetuin) を認識するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を選別し、次いで、前駆体である「LacNAc」及び哺乳動物体内に存在する糖鎖のうち目的オリゴ糖鎖と最も構造が近似する「3' -Sialyl-LacNAc」の糖鎖構造に対する反応性を有さないモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを選別する。

[0023] (3-3) 本発明のハイブリドーマの寄託

本発明の実施例で得られたハイブリドーマのうち、最も特異性及び親和性の高いモノクローナル抗体FR9を産生するハイブリドーマFR9は、2013年1月21日付で、N I T E 特許微生物寄託センターに寄託され、2013年3月13日付で「受託番号：NITE P-1516」が付与されたあと、2014年4月15日付で「NITE BP-01516」として国際寄託へ移管されている。

モノクローナル抗体FR9は、当該ハイブリドーマから通常の細胞培養法又は腹水形成法等により容易に得ることができる。

[0024] 4. 本発明の抗「CDw75」抗体の特性

(4-1) 抗「CDw75」抗体の糖鎖構造認識特異性

本発明の抗「CDw75」抗体は、糖鎖構造「CDw75」を糖鎖エピトープとして認識する。

免疫原とした糖脂質抗原「CDw75-C12L」及びCDw75(6' -Sialyl-LacNAc)糖鎖構造を含有する糖タンパク質 (Fetuin) を認識するが、前駆体である「LacNAc」及び哺乳動物体内に存在する糖鎖のうち目的オリゴ糖鎖と最も構造が近

似する「3' -Sialyl-LacNAc」の糖鎖構造は、糖脂質及び糖タンパク質の形態であっても認識しない。さらに、構造が近似するオリゴ糖鎖「6' -Sialyllactose (Sia $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4Glc)」も認識しないという高い認識特異性を有している。

本発明の実施例では、以下の方法により確認した。

「CDw75 (Sia $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc)」と共に「LacNAc (Gal $\beta$ 1,4GlcNAc)」、「3' -Sialyl-LacNAc (Sia $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc)」などの類似糖鎖を有する化合物を基板 (ELISAプレート) に蒸発乾固によって固定化し、ELISA法により、抗体価 (450nmの吸光度の強度) として評価した (図2)。固定化に用いた化合物を下記 (表1) に示す。表中、CerAは、セラミド類似体 (HOC H<sub>2</sub>CH(NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>-CH<sub>3</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>-CH<sub>3</sub>) を示し、水酸基を介してそれぞれの糖鎖の還元末端と結合させてある。Cerはセラミド (天然体) であり、LacCer, GM3, GM1, GD1aはそれぞれセラミドに糖鎖が結合した天然体の糖脂質である。RはFetuinの基幹構造 (表に示した糖鎖構造の還元側を構成するFetuin糖鎖及びコアタンパク質部分) を示す。

[0025]

[表1]

| Antigen  | Structure                                                                                           |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a1       | Sia $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-CerA                                                |
| b1       | Sia $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-CerA                                                |
| c1       | Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-CerA                                                                |
| LacCer   | Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1-Cer                                                                    |
| GM3      | Sia $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1-Cer                                                    |
| GM1      | Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1,4(Sia $\alpha$ 2,3)Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1-Cer                 |
| GD1a     | Sia $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1,4(Sia $\alpha$ 2,3)Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1-Cer |
| Fetuin   | Sia $\alpha$ 2,6(3)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R                                                |
|          | Sia $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1-R                                                  |
|          | Sia $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3(Sia $\alpha$ 2,6)GalNAc $\alpha$ 1-R                                |
| Fetuin-a | Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R                                                                   |
|          | Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1-R                                                                  |
| Fetuin-b | Sia $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R                                                   |
|          | Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R                                                                   |
|          | Sia $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1-R                                                  |
|          | Sia $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3(Sia $\alpha$ 2,6)GalNAc $\alpha$ 1-R                                |

[0026] 結果は、目的とするCDw75糖鎖に対する明らかな抗体価、及びCDw75以外の糖鎖に対する抗体価の欠如として確認した。また、糖タンパク質Fetuinは、「CDw75 (Sia $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc)」と共に「3' -Sialyl-LacNAc (Sia $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc)」を糖鎖構造として含むため、Fetuinに対する明らかな抗体価、並びにシアリダーゼ消化によるシアル酸の除去をしたFetuin(Fetuin-a)に対する抗体価の欠如、また「3' -Sialyl-LacNAc」構造を $\alpha$ 2,3シアリダーゼにて選択的に除去したFetuin(Fetuin-b)に対する抗体価が変化しないことを確認することで、抗「CDw75」抗体のCDw75に対する選択的な認識特異性を確認した。

比較のために市販されている抗CDw75抗体（LN-1）の糖鎖構造認識特異性についても同法により評価したところ、上記いずれの抗原に対しても検出限界以下であった（図示せず）。

同様に、上記の糖タンパク質Fetuin、Fetuin-a、Fetuin-bを用いたウエスタンブロット解析により、CDw75に対する選択的な認識特異性を確認した（図3）。

他に、市販の「糖鎖アレイ」を用いることでも、簡単に確認できる。

[0027] さらに、本発明の抗CDw75抗体（FR9抗体）の認識特異性の高さを実証するために、CDw75ときわめて類似した糖鎖構造である6'-Sialyllactoseを、固相化したFetuinとの競合阻害アッセイにより確認した（図4）。FR9抗体とFetuinとの反応は、CDw75糖鎖を加えることで阻害されるが、6'-Sialyllactoseを加えても阻害されないことから、6'-SialyllactoseがFR9抗体と反応しないことがわかる。

[0028] また、本発明の抗CDw75抗体（FR9抗体）が、CDw75糖鎖を、Fetuin糖タンパク質以外の糖タンパク質に含まれる場合であってもFetuinの場合と同様の反応性を有することと共に、当該反応性が選択的な認識特異性であることを、AGP糖タンパク質を用いたウエスタンブロット解析により確認した（図5）。ここで、AGP糖タンパク質はFetuin糖タンパク質同様に「CDw75（Sia $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc）」と共に「3'-Sialyl-LacNAc（Sia $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc）」を糖鎖構造として含むため、AGPに対して観察された抗体価が、シアル酸を除去したAGP（AGP-a）に対しては欠如し、かつ選択的に「3'-Sialyl-LacNAc」構造を除去したAGP（AGP-b）に対しては、抗体価が変化しないことを確認した。AGP、AGP-a、AGP-bの主な糖鎖構造を表2に示す。RはAGPの基幹構造（表に示した糖鎖構造の還元側を構成するAGP糖鎖及びコアタンパク質部分）を示す。

[0029]

[表2]

| Antigen | Structure                                            |
|---------|------------------------------------------------------|
| AGP     | Sia $\alpha$ 2,6(3)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R |
|         | Gal $\beta$ 1,4(Fuc $\alpha$ 1,3)GlcNAc $\beta$ 1-R  |
| AGP-a   | Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R                    |
|         | Gal $\beta$ 1,4(Fuc $\alpha$ 1,3)GlcNAc $\beta$ 1-R  |
| AGP-b   | Sia $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R    |
|         | Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R                    |
|         | Gal $\beta$ 1,4(Fuc $\alpha$ 1,3)GlcNAc $\beta$ 1-R  |

## [0030] (4-2) 高い親和性があることについて

Fetuinに対する抗CDw75抗体 (FR9抗体) の親和性 (解離定数: Kd値) について、ELISA法による算出法 (Friguet B., et al., J. Immunol. Methods, 77, 305-319, 1985) にて決定した。抗体を  $1 \times 10^{-7}$  M の濃度に PBS 等にて希釈調製し、 $25 \sim 1.56 \times 10^{-7}$  M の濃度になるように段階希釈した Fetuin と混和・インキュベーションすることで、抗原抗体複合体を形成させた。この混和液中の Free の抗体量を、 $1 \mu\text{g}$  の Fetuin を固相化抗原とした ELISA によって算出し、得られた値から Scatchard プロットによって Kd 値を決定した (図 1 A)。算出された Kd 値は、 $8.86 \times 10^{-7}$  M であり、糖鎖に結合する抗体やレクチンの Kd 値は一般的に  $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-6}$  M であることからみて、開発した抗 CDw75 抗体は強い親和性を有する。

前記市販 LN-1 抗体の Kd 値についても同法による算出を試みたが、CDw75 を含有する糖脂質、糖タンパク質を抗原とする LN-1 の抗体反応は ELISA では検出限界以下であった (図示せず)。

また、Fetuin 及び CDw75-C12L を段階希釈して固相化したプレートを用いた ELISA 法にて、作製した抗体がどの程度の量の抗原まで検出できるかを測定し

た（図 1 B）。

[0031] （４－３）がん細胞表層に存在するCDw75を検出できることについて

CDw75糖鎖は糖タンパク質や糖脂質の形態で細胞表層抗原として発現しており、細胞表層抗原は細胞診断や悪性腫瘍の分子標的となる。FR9抗体が細胞表層のCDw75と反応することを細胞蛍光染色法で確認した。CDw75を発現する高悪性度B細胞性腫瘍細胞（バーキットリンパ腫のRaji細胞）をFR9抗体とインキュベートした後、抗体反応を蛍光標識二次抗体にて標識し、蛍光検出装置で検出した（図 6）。FR9抗体を加えないネガティブコントロールと比較して、明らかな蛍光の増大が検出されたことから、FR9抗体がRaji細胞表層のCDw75に反応することがわかる。

[0032] 5. 本発明の抗「CDw75」抗体の用途

（５－１）本発明の抗「CDw75」モノクローナル抗体を有効成分とする医薬組成物

本発明の抗「CDw75」モノクローナル抗体は、進行したB細胞性腫瘍、胃癌及び／又は大腸癌細胞表面に多く発現する糖鎖抗原「CDw75」（非特許文献 3）をターゲットとする抗体医薬として用いることができる。すなわち、B細胞性腫瘍、胃癌又は大腸癌の抑制及び／又は治療のための医薬組成物の有効成分として用いられる。

また、「CDw75」糖鎖は、ヒト気管上皮組織に存在し、ヒトインフルエンザウィルスの主要な感染受容体となる（非特許文献 1）ため、本発明の抗「CDw75」モノクローナル抗体を投与すれば、ヒトインフルエンザウィルスの競合阻害剤として働く。すなわち、本発明の抗「CDw75」モノクローナル抗体は、インフルエンザウィルス感染受容体をターゲットとした抗体医薬として用いることができ、インフルエンザの予防及び／又は治療のための医薬組成物の有効成分として用いることができる。

本発明の抗「CDw75」モノクローナル抗体を、胃癌又は大腸癌用の抗体医薬組成物とする場合に、当該抗体にシクロフォスファミド、フルオロウラシル、ドキシルフルリジン、パクリタキセル、レボホリナート、メトトレキサ-

ト、イリノテカン、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、などの抗癌剤を結合させたコンジュゲートとして用いてもよい。さらに、他の胃癌又は大腸癌用の抗癌剤と組み合わせて併用することもできる。インフルエンザ用の抗体医薬組成物として用いる場合は、当該抗体に対してオセルタミビル、ザナミビルなどのノイラミニダーゼ阻害剤を結合させたコンジュゲートを用いることができ、さらに、他のインフルエンザ用治療薬と併用することもできる。

本発明の医薬組成物には、本発明のモノクローナル抗体の他に、必要に応じて薬学的に許容される担体（賦形剤、希釈剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤あるいはその他の添加剤など）を適宜含有させることができる。これらの医薬組成物は、錠剤、散剤、注射剤、カプセル剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができ、経口あるいは非経口的に投与することができる。投与量は、患者の症状の程度、年齢及び体重、投与方法などに依存し、有効成分である抗体の重量としては通常、約10ng～約100mg/kg体重の範囲である。胃癌及び／又は大腸癌の治療剤としては注射剤が好ましく、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の非毒性の薬学的に許容され得る担体中に0.1μg抗体/ml担体～10mg抗体/ml担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。

[0033] (5-2) 本発明の抗「CDw75」モノクローナル抗体を用いた、「CDw75」糖鎖の検出方法又は定量方法

本発明の抗「CDw75」モノクローナル抗体により、試料中の「CDw75」糖鎖エピトープ存在量を高感度で検出できると共に、正確な定量が可能である。

具体的には、本発明の抗「CDw75」モノクローナル抗体と被験者由来の試料とを接触させて、該試料中における「CDw75」糖鎖エピトープの存在量を測定する。

本発明のモノクローナル抗体を用いて、試料中における「CDw75」糖鎖エピトープの存在を定性的又は定量的に検出する方法としては、サンドイッチE

LISA等の酵素免疫測定法（EIA）、放射性免疫測定法（RIA）、イムノクロマト法、又はウエスタンブロッティング法を用いることができる。これらの技術は当業者に周知である。

[0034] （５－３）本発明の抗「CDw75」モノクローナル抗体を用いたB細胞性腫瘍、胃癌又は大腸癌の罹患と腫瘍悪性度の判定及び診断方法、並びにそのためのキット

さらに、本発明の抗「CDw75」モノクローナル抗体を用いて、「CDw75」糖鎖を検出及び／又は定量することで、被験者がB細胞性腫瘍、胃癌又は大腸癌に罹患しているか否かを判定できると共に、胃癌又は大腸癌患者の腫瘍の悪性度を判定できる。

すなわち、本発明の抗「CDw75」モノクローナル抗体は、B細胞性腫瘍、胃癌又は大腸癌の検出方法、判定方法、もしくは悪性度の診断方法に用いることができ、また、そのための検出用キット、判定用キット、もしくは診断用キットなどとして用いることができる。その場合には、必要に応じて、薬学的に許容される担体、賦形剤、希釈剤などを適宜含有させることができる。

胃癌又は大腸癌の罹患の有無、腫瘍悪性度の判定、診断に際しては、本発明のモノクローナル抗体と被験者由来の試料とを接触させて、該試料中における「CDw75」糖鎖エピトープの存在量を測定することによって、胃癌又は大腸癌に罹患しているか否かと共に、罹患している胃癌又は大腸癌の悪性度を判定することができる。その際、あらかじめ既知の悪性度の胃癌又は大腸癌患者由来試料並びに胃潰瘍もしくは良性腫瘍試料及び／又は正常な試料からの「CDw75」糖鎖エピトープ量の測定値に基づき検量線を引いておくことで、より正確な判定が可能となる。さらに、既知の胃癌又は大腸癌マーカー検出用のモノクローナル抗体、レクチンなどを併用することで、検出精度を高めることができる。

[0035] （５－４）「CDw75」糖鎖含有化合物又は「CDw75」糖鎖抗原を細胞表面に有する細胞の精製

「CDw75」糖鎖含有化合物又は「CDw75」糖鎖抗原を細胞表面に有する細胞

の精製を行う場合、本発明の抗「CDw75」モノクローナル抗体を、アガロースやセルロースからなるカラム担体にプロテインA、プロテインGなどの抗体結合性タンパク質、水溶性カルボジイミド（WSC）、グルタルアルデヒドなどのクロスリンカーを介して結合させてアフィニティカラムを調製し、糖鎖含有試料を通す。通塔後、吸着した「CDw75」糖鎖含有化合物又は「CDw75」糖鎖抗原を細胞表面に有する細胞を回収する。

抗「CDw75」モノクローナル抗体をプロテインA、プロテインGなどの抗体結合性タンパク質、及び水溶性カルボジイミド（WSC）、グルタルアルデヒドなどのクロスリンカーを介して結合させたビーズ（磁気ビーズ）を用いて吸着させてもよい。

## 実施例

[0036] 以下に実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

本発明におけるその他の用語や概念は、当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものであり、本発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。また、各種の分析などは、使用した分析機器又は試薬、キットの取り扱い説明書、カタログなどに記載の方法を準用して行った。

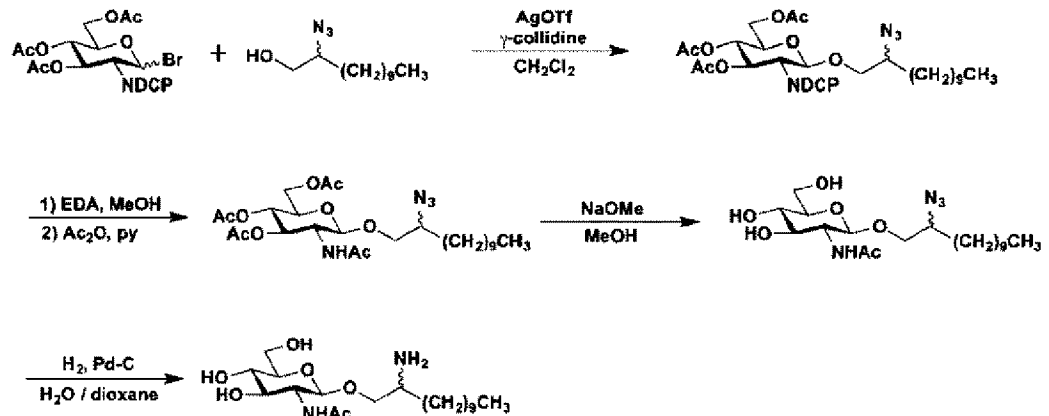
なお、本明細書中に引用した技術文献、特許公報及び特許出願明細書中の記載内容は、本発明の記載内容として参照されるものとする。

[0037] （実施例1）糖脂質抗原「CDw75-C12L」の製造

N-アセチル-グルコサミンから誘導される糖供与体3,4,6-トリ-O-アセチル-2-デオキシ-2-(4,5-ジクロロフタルイミド)-D-グルコピラノシル ブロミド (Shimizu H. et al., Biosci. Biotech. Biochem., 60, 73-76, 1996)と、受容体となる2-アジドアルキルアルコール $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}(\text{N}_3)\text{CH}_2\text{OH}$ をグリコシル化反応によりカップリングさせた後、ヒドロキシ基の脱保護反応、側鎖アジド基の還元反応などを行い、アミノ基を有したグルコサミン誘導体 $\text{GlcNAc-CH}_2\text{CH}$

$(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$ を合成した。

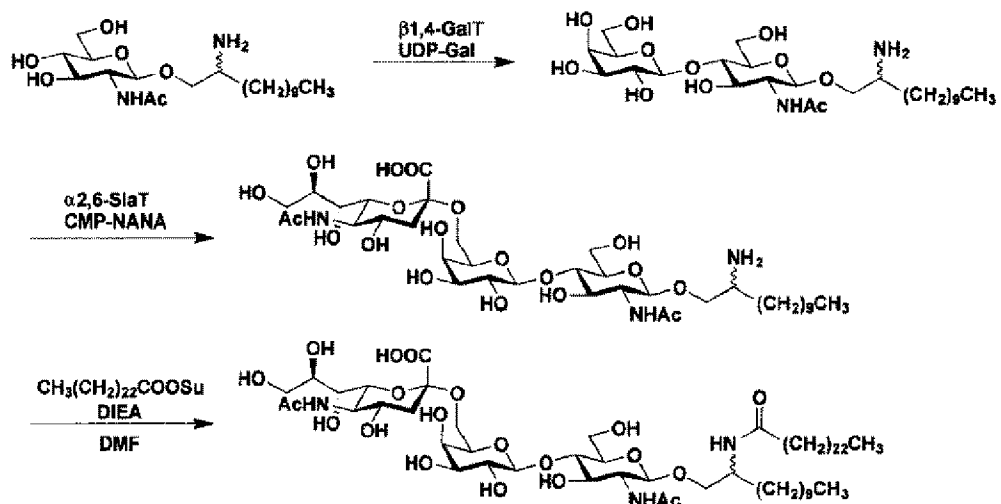
[0038] [化4]



・・・反応式 (1)

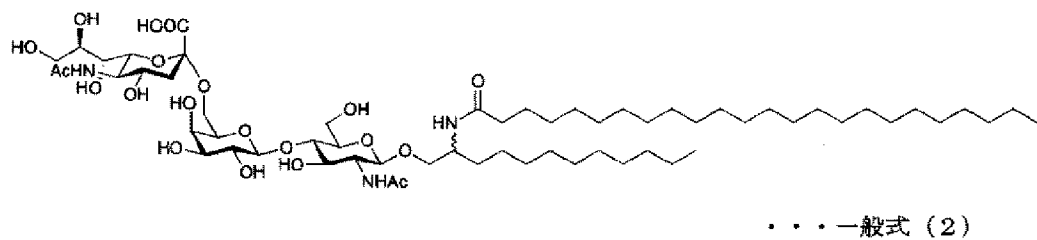
[0039] 得られた中間体化合物を、下記反応式 (2) に従って、 $\beta$ 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼを用いた酵素反応に供し、糖鎖を伸長してLacNAc- $\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$ へと変換し、さらに、 $\alpha$ 2,6-シアリルトランスフェラーゼを用いた酵素反応に供しシアリル3糖体へと誘導した。次いで、6'-Sialyl-LacNAc- $\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$ の側鎖アミノ基とリグノセリン酸をアミド化反応により縮合し、下記一般式 (2) で表される「CDw75-C12L」を合成した。

[0040] [化5]



・・・反応式 (2)

[0041] [化6]



[0042] 「CDw75-C12L」は、順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:エタノール:水=6:2:1)により精製した後、<sup>1</sup>H-NMRスペクトルおよびMALDI-TOFによる質量分析により上記構造であることの確認を行った。

[0043] (実施例2) 抗CDw75モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの製造

糖脂質抗原「CDw75-C12L」100 $\mu$ gを、リポソーム法(Brodinらの方法; Eur. J. Immunol., 16, 951-956, 1986)に従い、リン脂質、コレステロール、Lipid-Aとメタノール溶液中にて混合し、蒸発させた後に50℃のPBS緩衝液中に溶解することでリポソームを形成させ、これを免疫原としてマウス(C3H/HeN strain)を免疫した。

免疫誘導剤は2週間間隔で4回皮下に免疫し、2週間後に腹腔内に免疫した後、3日後に脾臓細胞を採取し、ミエローマ細胞Sp1株と細胞融合することでハイブリドーマ細胞を作製した。

まず、96ウェルプレート8枚にコロニー数1/ウェルになるよう(計768ウェル)培養したハイブリドーマ細胞の培養上清を0.05 mlずつ採取し、抗体価としてELISA法による450nmの吸光度0.1以上を指標として、6'-Sialyl-LacNAc (CDw75) 糖鎖構造を含有する糖タンパク質(Fetuin)を認識するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を選別したところ、131ウェルにて陽性クローンを得た(出現率17.1%)。

培養上清中の抗体価はELISA法により評価し、抗体価(吸光度)は、二次抗体として用いた抗マウスイムノグロブリン抗体の標識酵素であるペルオキシダーゼの活性として評価した。ペルオキシダーゼの発色基質にはTMBを用い、反応後に2規定の硫酸を加えた後の450nmの吸光度の強度を評価した。

次いで、免疫原とした糖脂質抗原「CDw75-C12L」を認識するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞40個を選別し、更に前駆体である「LacNAc」及び哺乳動物体内に存在する糖鎖のうち目的オリゴ糖鎖と最も構造が近似する「3'-Sialyl-LacNAc」の糖鎖構造を有する糖脂質（表1、b1、c1）、及び糖タンパク質（Fetuin-a）に対する反応性を有さないモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞2個を選別した。

これらのハイブリドーマから得られるモノクローナル抗体は、いずれも「CDw75」糖鎖構造に対して特異性の高い抗CDw75モノクローナル抗体であり、本発明の抗CDw75モノクローナル抗体である。

これら2個のハイブリドーマ中で、最も抗体価が高く、特異性、親和性が優れた抗CDw75モノクローナル抗体を産生する「ハイブリドーマFR9」を、2013年1月21日付でNITE特許微生物寄託センターに寄託し、2013年3月13日付で受託番号「NITE P-1516」が付与されたあと、2014年4月15日付で「NITE BP-01516」として国際寄託へ移管されている。

[0044]（実施例3）ハイブリドーマFR9が産生するモノクローナル抗体の評価

（3-1）CDw75に対する親和性

FR9細胞の培養上清中に含まれるモノクローナル抗体（以下「FR9抗体」ともいう。）のCDw75に対する親和性について、CDw75を含有するFetuinを抗原とした解離定数（Kd値）を決定することで評価したところ、そのKd値は $8.86 \times 10^{-7}$  Mであった。糖鎖に結合する抗体やレクチンのKd値は、一般的に $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-6}$  Mであることから、開発した抗体はCDw75糖鎖に対する強い親和性を有する（図1A）。

比較のために市販されている抗CDw75抗体（LN-1）のKd値についても同法による算出を試みたが、CDw75を含有する糖脂質、糖タンパク質を抗原とするLN-1の抗体反応はELISAでは検出限界以下であり、CDw75糖鎖そのものに対する親和性が非常に低い抗体であることが確認された（図示せず）。

ELISAによるFetuin及びCDw75-C12Lの検出限界の測定結果では、FR9抗体は、極微量なFetuin（約15 ng）を検出可能であった（図1B）。

[0045] (3-2) FR9抗体の抗原認識特異性 (ELISA法)

次に、FR9抗体の抗原認識特異性についてELISA法により評価した (図2)。  
用いた抗原の糖鎖構造は、前記 (表1) に示された通りである。FR9抗体は、抗原としたCDw75構造を有する糖脂質、糖タンパク質のみを厳密にエピトープ識別し、構造が近似する3'-Sialyl-LacNAc構造や前駆体であるLacNAc構造には反応しないため、開発した抗体はCDw75糖鎖に対する高い特異性を有する。

比較のために上記抗CDw75抗体 (LN-1) の糖鎖構造認識特異性についても同法により評価したが、上記いずれの抗原に対しても検出限界以下であり、CDw75糖鎖構造そのものに対する認識能自体が低い抗体であった (図示せず)。

[0046] 更に、競合阻害アッセイ (図4) にてFR9抗体が6'-Sialyllactoseと反応しないことも確認した。具体的には、FR9抗体にあらかじめ競合剤としてCDw75、6'-Sialyllactoseを加えてインキュベートした後に、Fetuin (1  $\mu$ g) を固相化した96 wellプレートと反応させ、FR9抗体とFetuinとの反応をELISAにて評価した。その結果、FR9抗体とFetuin糖タンパク質の結合反応は、CDw75オリゴ糖鎖を競合剤として加えた場合、濃度依存的に阻害されるが、6'-SialyllactoseはCDw75の100倍量を加えたとしても反応を阻害しなかった。この結果は、FR9抗体はCDw75と極めて構造に近い6'-Sialyllactoseとは反応しないことを示す。よって開発した抗体はCDw75糖鎖に対する高い特異性を有することがわかる。

[0047] (3-3) FR9抗体の抗原認識特異性 (ウエスタンブロット法)

続けて、FR9抗体が特定のタンパク質検出に汎用されるウエスタンブロット法に適用可能かどうかを検討した (図3)。

抗原としたCDw75 (6'-Sialyl-LacNAc) 構造を含むFetuin 糖タンパク質を、2種類のシアリダーゼにて処理したものを調製し、特異性の解析も平行して行ったところ、FR9抗体はFetuin糖タンパク質を検出し、CDw75糖鎖を酵素反応にて消失させたものには反応せず、一方で3'-Sialyl-LacNAc糖鎖を選択的に消失させたFetuin糖タンパク質には未処理のFetuin同等に反応した。

以上の結果より、開発した抗CDw75抗体は、ウエスタンブロット法に応用した場合でも、高い特異性・検出感度にてCDw75糖鎖を検出可能な、応用性の広い抗体であることが確認された。

[0048] 更に、異なる糖タンパク質であっても含まれるCDw75糖鎖にFR9抗体が反応することを、AGPを抗原として用いたウエスタンブロット法にて確認した（図5）。AGP糖タンパク質はFetuin糖タンパク質同様に「CDw75（Sia $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc）」と共に「3'-Sialyl-LacNAc（Sia $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc）」を糖鎖構造として含む（表2）。そこで、AGP糖タンパク質と共に、AGPからシアリダーゼ消化によりCDw75構造を選択的に除去したAGP（AGP-a）、及び $\alpha$ 2,3シアリダーゼ消化により「3'-Sialyl-LacNAc」構造を選択的に除去したAGP（AGP-b）それぞれに対して本発明のFR9抗体を作用させた。FR9抗体はAGP糖タンパク質を検出し、CDw75糖鎖を酵素反応にて消失させたものには反応せず、一方で3'-Sialyl-LacNAc糖鎖を選択的に消失させたAGP糖タンパク質には未処理のFetuin同等に反応した（図5）。

以上の結果より、本発明の抗CDw75抗体は、CDw75を含むどのような糖タンパク質でも検出可能であり、ウエスタンブロット法に応用した場合でも、高い特異性・検出感度にてCDw75糖鎖を検出可能な、応用性の広い抗体であることが確認された。

また、同時に本発明の抗CDw75抗体は、きわめて厳密にSia $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAcで表される糖鎖構造CDw75を認識する特異性の高い抗体であり、交差反応性により表現すると、「Sia $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAcで表される糖鎖構造を認識し、Gal $\beta$ 1,4GlcNAc、Sia $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc及び6'-Sialyllactose（Sia $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4Glc）で表される糖鎖構造は認識しない、抗CDw75モノクローナル抗体」である、と表現できる。

[0049] （3－4）FR9抗体の抗原認識特異性（細胞蛍光染色法）

続いて、細胞表層に発現するCDw75を検出できることを細胞蛍光染色法で確認した。細胞表層抗原は細胞診断や悪性腫瘍の分子標的となることから、FR9抗体が細胞表層のCDw75と反応すれば、診断や治療薬に応用できる。CDw75を

発現する高悪性度B細胞性腫瘍細胞(バーキットリンパ腫のRaji細胞)をFR9抗体及び蛍光標識二次抗体にて標識し、蛍光検出装置で検出したところ、FR9抗体を加えないネガティブコントロールと比較して、明らかな蛍光の増大が検出された。この結果から、FR9抗体がRaji細胞表層のCDw75に反応することが確認された(図6)。

[0050] (3-5) 先行技術文献(非特許文献6)に記載されたCDw75糖鎖抗原を認識するモノクローナル抗体との比較

先行技術文献(非特許文献6)においても、抗CDw75糖鎖抗原を認識するモノクローナル抗体(241-5-2抗体)が得られているので、その特異性及び親和性を本発明のFR9抗体の結果と比較する。

非特許文献6中の記載によれば、得られた241-5-2抗体は、CDw75糖鎖を含むFetuin糖タンパク質と反応するものの、当該241-5-2抗体が認識するエピトープは、CDw75糖鎖「6'-Sialyl-LacNAc (Sia $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc)」中の部分構造である「Sia $\alpha$ 2,6構造」であると推測されている(同第303頁)。つまり、241-5-2抗体はCDw75糖鎖に特異的な抗体とはいえず、「Sia $\alpha$ 2,6構造」を有している糖鎖であれば反応する。

一方、本発明のFR9抗体はCDw75糖鎖の微細構造まで認識する抗体であり、Sia $\alpha$ 2,6構造のみでなく還元末端のGlcNAc構造までも含めた「6'-Sialyl-LacNAc (Sia $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc)」の全長がエピトープである。GlcNAcがGlcであると反応しないという厳密なエピトープの認識特異性を有しており(図4)、既存の抗体と比較して極めて高い特異性を達成できたといえる。

また、非特許文献6中における241-5-2抗体についてのELISAによる測定結果(同第302頁)によると、Fetuin検出のために50 $\mu$ g以上のFetuinを必要としている。一方、本発明のFR9抗体は、極微量なFetuin(約15 ng)であっても検出可能である(図1B)。このことからみて、本発明のFR9抗体は、CDw75糖鎖抗原に対する親和性に関しても、非特許文献6の241-5-2抗体と比較して、3000倍以上の高い検出感度が達成できたといえる。

**産業上の利用の可能性**

[0051] インフルエンザ用抗体医薬、B細胞性腫瘍、進行性胃癌、大腸癌用の抗体医薬及び診断剤の他、基礎研究用試薬、糖鎖アレイなどの糖鎖解析システムや病理解析キット等でも利用可能である。

SJU5165240WO

PCT

[0052]

|       |                                                                                  |                                                             |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 0-1   | 様式 PCT/RO/134 (SAFE)<br>この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、<br>右記によって作成された。 | PCT-SAFE<br>Version 3.51.060.236a MT/FOP 20131001/0.20.5.21 |
| 0-1-1 |                                                                                  |                                                             |
| 0-2   | 国際出願番号                                                                           |                                                             |
| 0-3   | 出願人又は代理人の書類記号                                                                    | SJU5165240WO                                                |

|       |                                        |                                                                                                         |
|-------|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1     | 下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。 |                                                                                                         |
| 1-1   | 段落番号                                   | 0010, 0023, 0043                                                                                        |
| 1-3   | 寄託の表示                                  |                                                                                                         |
| 1-3-1 | 寄託機関の名称                                | NPMD Patent Microorganisms Depositary (NPMD),<br>National Institute of Technology and Evaluation (NITE) |
| 1-3-2 | 寄託機関のあて名                               | #122, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba<br>292-0818, Japan                                      |
| 1-3-3 | 寄託の日付                                  | 2013年 01月 21日 (21.01.2013)                                                                              |
| 1-3-4 | 受託番号                                   | NPMD NITE BP-01516                                                                                      |
| 1-5   | この表示を行うための指定国                          | すべての指定国                                                                                                 |

## 受理官庁記入欄

|       |                               |       |
|-------|-------------------------------|-------|
| 0-4   | この用紙は国際出願とともに受理した<br>(はい/いいえ) | ✓     |
| 0-4-1 | 権限のある職員                       | 関口 富夫 |

## 国際事務局記入欄

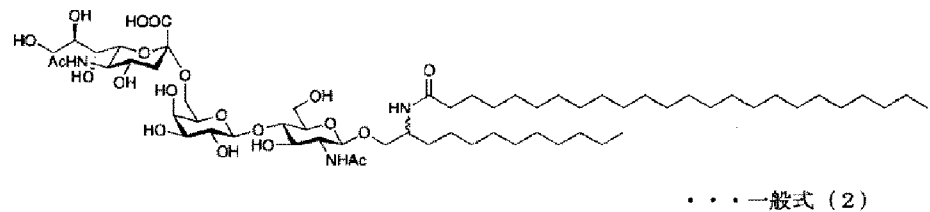
|       |                   |  |
|-------|-------------------|--|
| 0-5   | この用紙が国際事務局に受理された日 |  |
| 0-5-1 | 権限のある職員           |  |

## 請求の範囲

[請求項1] Sia $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAcで表される糖鎖構造CDw75を認識するが、Gal $\beta$ 1,4GlcNAc、Sia $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc及び6'-Sialyllactose (Sia $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4Glc) で表される糖鎖構造は認識しない、抗CDw75モノクローナル抗体又はそのフラグメント。

[請求項2] 下記一般式(2)で表される糖脂質抗原CDw75-C12Lを免疫原として得られる、請求項1に記載の抗CDw75モノクローナル抗体又はそのフラグメント。

[化1]



[請求項3] ハイブリドーマFR9(受託番号NITE BP-01516)により産生される、請求項1又は2に記載の抗CDw75モノクローナル抗体又はそのフラグメント。

[請求項4] 請求項1～3のいずれかに記載の抗CDw75モノクローナル抗体又はそのフラグメントと、薬学的に許容される担体を含む組成物。

[請求項5] 請求項4に記載の組成物であって、B細胞性腫瘍、胃癌又は大腸癌の抑制及び／又は治療のための医薬組成物。

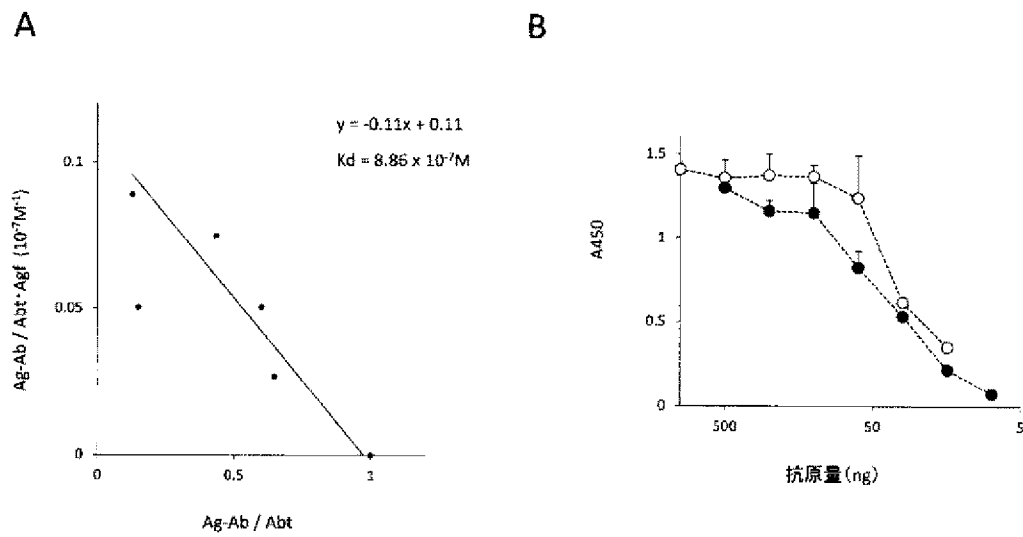
[請求項6] 請求項4に記載の組成物であって、インフルエンザの予防及び／又は治療のための医薬組成物。

[請求項7] 請求項4に記載の組成物であって、B細胞性腫瘍、胃癌又は大腸癌に対する検出用及び／又は診断用組成物。

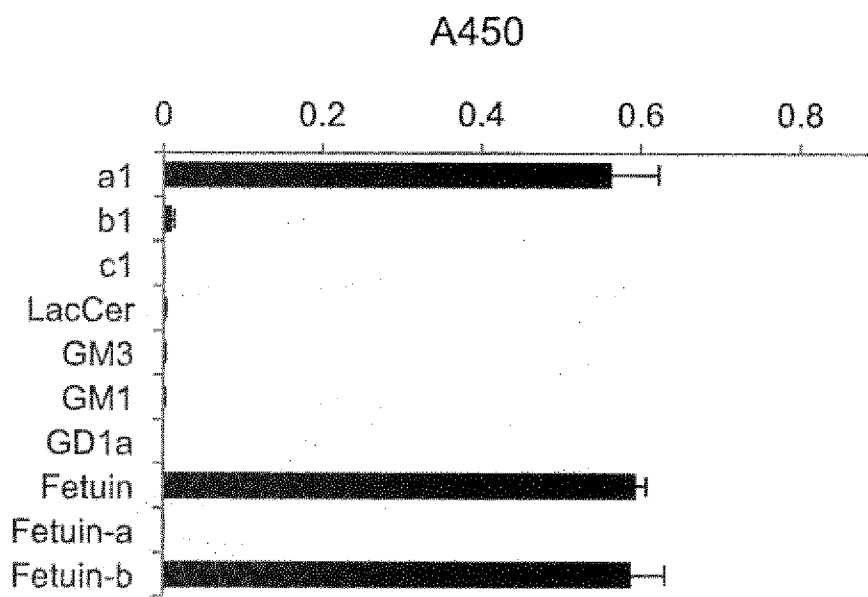
[請求項8] 請求項1～3のいずれかに記載の抗CDw75モノクローナル抗体又はそのフラグメントを用いることを特徴とする、糖鎖抗原CDw75の検出及び／又は定量方法。

- [請求項9]           請求項1～3のいずれかに記載の抗CDw75モノクローナル抗体又はそのフラグメントを有効成分とする、胃癌又は大腸癌の罹患及び／又は腫瘍悪性度判定用キット。
- [請求項10]           請求項1～3のいずれかに記載の抗CDw75モノクローナル抗体又はそのフラグメントを用いることを特徴とする、糖鎖抗原CDw75を有する化合物の精製方法。
- [請求項11]           請求項1～3のいずれかに記載の抗CDw75モノクローナル抗体又はそのフラグメントを用いることを特徴とする、糖鎖抗原CDw75を有する細胞の単離方法。
- [請求項12]           抗CDw75モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマFR9（受託番号NITE BP-01516）。

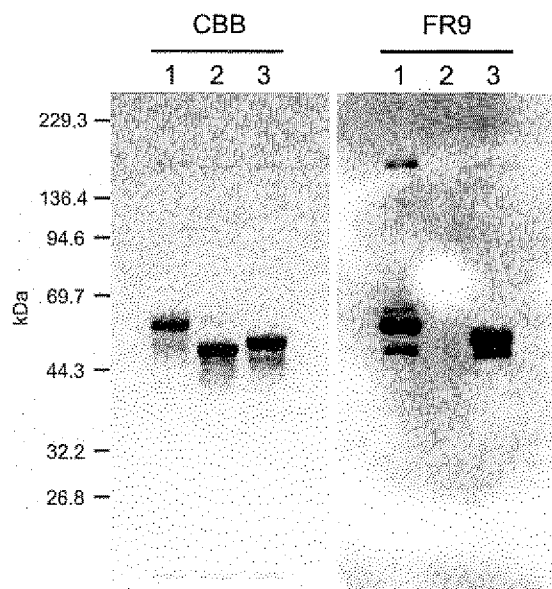
[図1]



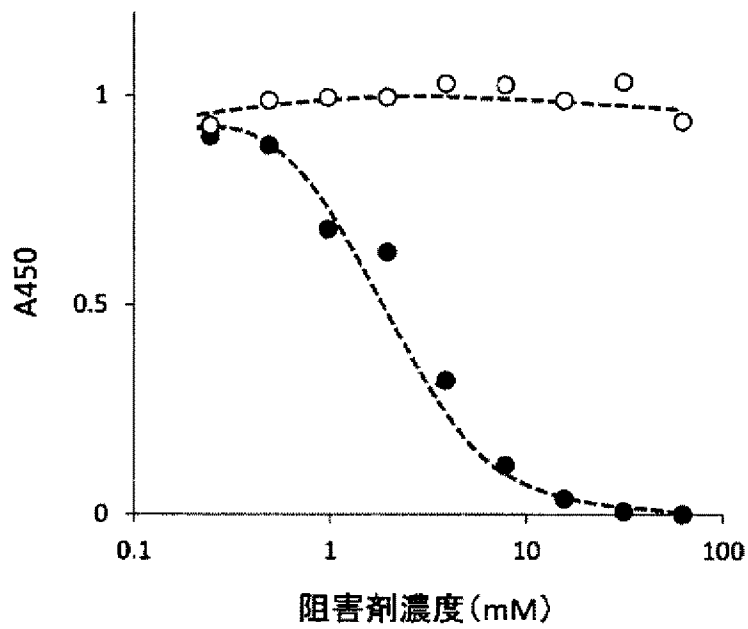
[図2]



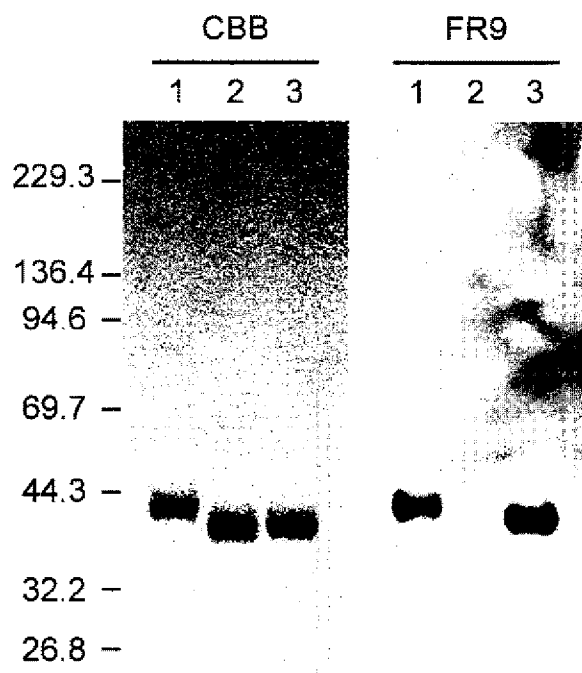
[図3]



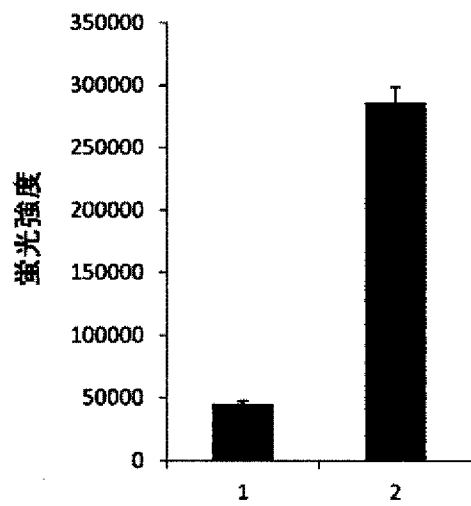
[図4]



[図5]



[図6]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/002402

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/18(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n

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)

C07K16/18, A61K39/395, A61P35/00, C12N5/10, G01N33/53, G01N33/574, G01N33/577, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

|                           |           |                            |           |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho       | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2014 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2014 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2014 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), BIOSIS/MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                               | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | MURAKAMI D. ET AL, Convenient preparation and characterization of a monoclonal antibody for the N-linked sugar chain of a glycoprotein using a microbial endoglycosidase., Arch. Biochem. Biophys., 2008, Vol.477, No.2, p.299-304, entire text  | 1-12                  |
| A         | BAST B.J. ET AL, The HB-6, CDw75, and CD76 differentiation antigens are unique cell-surface carbohydrate determinants generated by the beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. J. Cell. Biol., 1992, Vol.116, No.2, p.423-435, entire text | 1-12                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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  
08 July, 2014 (08.07.14)

Date of mailing of the international search report  
22 July, 2014 (22.07.14)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2014/002402

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | COSTA-NOGUEIRA C. ET AL, Synthesis and expression of CDw75 antigen in human colorectal cancer., BMC Cancer, 2009, Vol.9, Article:431, entire text | 1-12                  |

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07K16/18(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n

## 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（I P C））

Int.Cl. C07K16/18, A61K39/395, A61P35/00, C12N5/10, G01N33/53, G01N33/574, G01N33/577, C12P21/08

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

|             |                     |
|-------------|---------------------|
| 日本国実用新案公報   | 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1 9 7 1 - 2 0 1 4 年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1 9 9 6 - 2 0 1 4 年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1 9 9 4 - 2 0 1 4 年 |

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), BIOSIS/MEDLINE(STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| A               | MURAKAMI D. ET AL, Convenient preparation and characterization of a monoclonal antibody for the N-linked sugar chain of a glycoprotein using a microbial endoglycosidase., Arch. Biochem. Biophys., 2008, Vol.477, No.2, p.299-304, 全文  | 1-12           |
| A               | BAST B.J. ET AL, The HB-6, CDw75, and CD76 differentiation antigens are unique cell-surface carbohydrate determinants generated by the beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. J. Cell. Biol., 1992, Vol.116, No.2, p.423-435, 全文 | 1-12           |

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ 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

「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  
「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  
「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）  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「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  
「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  
「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  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 8 . 0 7 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

2 2 . 0 7 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）  
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5  
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）

柴原 直司

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

4 N

3 5 3 4

| C（続き）． 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                          |                |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 |
| A                   | COSTA-NOGUEIRA C. ET AL, Synthesis and expression of CDw75 antigen in human colorectal cancer., BMC Cancer, 2009, Vol.9, Article:431, 全文 | 1-12           |