

明 細 書

発明の名称：新規な抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント

技術分野

[0001] 本発明は、新規な抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントに関する。本発明はまた、当該抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを含む診断用及び/又は治療用組成物、及び、当該Fabフラグメントを用いて癌を診断及び/又は治療する方法に関する。

背景技術

[0002] ムチン1 (Mucin1: MUC1) は、乳腺、気管及び消化管等の上皮組織を構成する上皮細胞の内腔側に発現する膜結合型糖タンパク質である (Nat. Rev. Cancer, 2004 Jan; 4 (1): 45-60.)。MUC1は乳癌 (Mod. Pathol., 2005 Oct; 18 (10): 1295-304.)、肺癌 (Hum. Pathol., 2008 Jan; 39 (1): 126-36.)、大腸癌 (Int. J. Oncol., 2000 Jan; 16 (1): 55-64.)、膀胱癌 (PLoS One, 2014 Mar; 9 (3): e92742.)、皮膚癌 (Histopathology, 2000 Sep; 37 (3): 218-23.)、甲状腺癌 (J. Pathol., 2003 Jul; 200 (3): 357-69.)、胃癌 (J. Pathol., 2000 Mar; 190 (4): 437-43.)、膵臓癌 (Int. J. Oncol., 2004 Jan; 24 (1): 107-13.)、腎臓癌 (Mod. Pathol., 2004 Feb; 17 (2): 180-8.)、卵巣癌 (Gynecol. Oncol., 2007 Jun; 105 (3): 695-702.) 及び子宮頸癌 (Am. J. Clin. Pathol., 2004 Jul; 122 (1): 61-9.) 等の癌細胞で過剰に発現しており、MUC1は癌病巣を検出するための標的分子として有用である (Nat. Rev. Cance

r, 2004 Jan; 4 (1) : 45-60.、Pathol. Res. Pract., 2010 Aug 15; 206 (8) : 585-9.)。

- [0003] MUC 1 は細胞外ドメインに存在する 20 アミノ酸のタンデムリピート配列である HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA (配列番号 15) の 9 番目のスレオニンが O-グリコシル化される。癌細胞ではこの O-グリコシル化が不完全であり、T (Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr)、Tn (GalNAc α 1-O-Ser/Thr) 及び 2, 3ST (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr) 等の O-グリコシル化が癌特異的に起こることが知られている (特許文献 1、非特許文献 1)。正常組織の MUC 1 は、これらの癌特異的な O-グリコシル化は受けないため、ヒト癌特異的 MUC 1 はヒトでの各種癌を治療するための標的分子として特に有用である。
- [0004] このような抗ヒト癌特異的 MUC 1 抗体として、例えば 1B2 抗体 (特許文献 1)、Pankoma b 抗体 (非特許文献 2)、5E5 抗体 (特許文献 2) 等が知られている。これらの抗体のうち、1B2 抗体は Pankoma b 抗体に比較してヒト癌特異的 MUC 1 に対する特異性が高いことが報告されている (特許文献 1)。また、1B2 抗体の解離定数は 3.7×10^{-10} M (特許文献 1) であり、5E5 抗体の解離定数は、 1.7×10^{-9} M (非特許文献 1) であることが報告されている。
- [0005] 一方、癌病巣の可視化にも大きなニーズがある。まず、癌病巣の早期発見にニーズがある。現在の X 線撮像やエコー、コンピューター断層撮影 (Computed Tomography: CT)、核磁気共鳴イメージング (Magnetic Resonance Imaging: MRI)、陽電子放出断層撮影 (Positron Emission Tomography: PET)、単一光子エミッション断層撮影 (Single Photon Emission Computed Tomography: SPECT) 等の診断モダリティでは、微小癌を感度良く検出できない。微小癌

を検出できれば、原発癌であれば手術や放射線療法により治癒できるし、転移癌であっても早期の薬剤介入により延命、治癒しうる。次に、癌病巣と良性病変との鑑別にニーズがある。現在の診断モダリティでは、良性病変を癌病巣と誤診してしまうことが多い。癌病巣と良性病変を鑑別できれば、不要な生検を減少できる。さらに、手術中の癌病巣の可視化にニーズがある。現在では、乳癌及び膀胱癌、皮膚癌をはじめとする癌の手術中において、癌病巣の位置や広がり、正確に把握できないために、癌病巣を完全に切除できず、癌細胞が遺残したまま手術を終了してしまう危険がある。更に、的確な癌病巣の位置の把握にニーズがある。血中の腫瘍マーカーの上昇で、術後の再発及び転移が疑われても、現在の診断モダリティでは微小な転移癌を可視化できないため、本当に転移しているのか、どの臓器に転移しているのか分からず、最適な治療の選択ができない。したがって、ヒト癌特異的MUC1に特異的に結合する抗体を体内診断薬として用いて、蛍光イメージング及びγ線イメージング（PET、SPECT）等の分子イメージングの技法により癌病巣を可視化することも有用である。しかし現在までの抗ヒト癌特異的MUC1抗体を体内診断薬として使用された例は、知られていない。

[0006] また、抗体と癌治療薬を結合させた抗体医薬にニーズがある。抗体医薬は特異的に癌病巣に癌治療剤を送達しうる点から副作用の少ない癌治療方法として期待されており、放射性同位元素を結合させた抗体を用いる放射免疫療法（鶴尾隆著、「がんの分子標的治療」南山堂出版、2008年9月15日発行、p. 332～336、J. Nucl. Med., 2016 Jul; 57 (7) : 1105-11.、Nucl. Med. Biol., 2010 Nov; 37 (8) : 949-55.）や、IRDye700DXを結合させた抗体を用いる光免疫療法（Nat. Med., 2011 Dec; 17 (12) : 1685-91.）等が報告されている。IRDye700DXは、診断にも用いることができる近赤外蛍光色素であり、これを癌細胞膜に発現する抗原に対する抗体に結合させ、癌組織に特異的に集積させた後に近赤外光を照射することで、IRDye700DXによる光毒

性効果により、癌特異的に細胞死を誘導できることが報告されている（*Nat. Med.*, 2011 Dec; 17 (12) : 1685-91.）。しかし現在まで、抗ヒト癌特異的MUC1抗体を癌治療薬と結合させた抗体医薬を臨床応用した例は、知られていない。

[0007] 一般に抗体は血中半減期が長く、体内に投与後、癌を可視化するのに十分なシグナル対バックグラウンド比を与える腫瘍対血液比に達するのに4日～5日の長い期間を必要とする（*Clin. Pharmacol. Ther.*, 2010 May; 87 (5) : 586-92.）。また抗体のFc領域は、抗体依存性細胞障害（Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity: ADCC）や補体依存性細胞障害（Complement-Dependent Cytotoxicity: CDC）の薬理作用を引き起こす（非特許文献1、*Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002 Dec; 13 (6) : 609-14.）。また抗体は標的に関わらず肝臓に高集積するが、乳癌等の癌細胞は肝臓へ転移するケースが多く、遠隔転移による全身の癌病巣を診断するときに肝転移の検出に妨げとなる（*Clin. Pharmacol. Ther.*, 2010 May; 87 (5) : 586-92.）。

[0008] 例えば、Fab、scFV、ダイアボディ、ミニボディのような低分子化された組み換え抗体フラグメントは、組織浸透性が高いため病巣に届きやすく、大腸菌や酵母での発現系を用いた低コストでの製造が期待できることから治療用抗体として利用される一方、血中半減期が短く、腎排泄される特徴を有することから、診断薬としての利用も報告されている（*Nat. Biotechnol.*, 2005 Sep; 23 (9) : 1126-36.）。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1: WO2010/050528

特許文献2: WO2008/040362

非特許文献

[0010] 非特許文献1: Glycoconj. J., 2013 Apr; 30 (3) : 227-36.

非特許文献2: Cancer Immunol Immunother, 2006 Nov; 55 (11) : 1337-47.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 一価のFabフラグメントは、分子量約50kDaであり、約150kDaの抗体より小さく、腎排泄され、血中半減期も短い。そのため、投与後2～32時間以内に癌を可視化するのに十分なシグナル対バックグラウンド比を与える腫瘍対血液比に達する。Fc領域がないためADCCやCDCを引き起こすこともない。Fabフラグメントは、主に腎排泄なため、肝転移の検出の妨げになることもない。このような特長から、抗体と比べ、Fabフラグメントは、体内診断薬としてより有効であることが期待できる。

[0012] しかしながらFabフラグメントでは、二価から一価になるため、その結合活性が減弱することが多い。さらに抗体を体内診断薬や光免疫療法で用いる薬剤として利用するためには、蛍光色素又は造影剤等の検出される物質で標識しなければならないが、そのような物質で標識されることにより、その結合活性が減弱するとの課題がある。

[0013] 本発明の課題は、優れた結合活性を有し、かつ投与後一定時間（例えば、24時間）の間に癌病巣に集積することが期待される抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを提供することにある。また、本発明の課題は、当該Fabフラグメントを含む診断用組成物及びそれを利用した診断方法を提供すること、並びに、当該Fabフラグメントを含む治療用組成物及びそれを利用した治療方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者らは、ヒト癌特異的MUC1に対する優れた結合活性を有する抗

ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの作製において相当の鋭意検討を重ねた結果、配列番号8又は配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号12に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを作製し（実施例1）、当該抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントはヒト癌特異的MUC1に対する優れた結合活性を有し（実施例3）、蛍光標識化及びキレート剤標識化によってヒト癌特異的MUC1に対する結合活性が減弱しないこと（実施例5及び実施例7）、並びに当該抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを含む複合体は、癌の診断に有用であること（実施例8、実施例12及び実施例13）、及び皮下担癌モデルにおいて抗腫瘍効果を示すこと（実施例15）を見出した。

[0015] これらの結果、前記抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント及び当該抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを含む複合体を用いた診断手段及び治療手段を提供した。

[0016] 本発明は、医学上又は産業上有用な物質・方法として以下の発明を含むものである。

[0017] すなわち、一態様において、本発明は以下のとおりであってよい。

[1] 以下の（a）及び（b）からなる群より選択される、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント：

（a）配列番号8又は配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び配列番号12に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント；及び

（b）配列番号8又は配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域であって、配列番号8又は配列番号10のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント、及び、配列番号12に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント。

[2] 以下の (a) 及び (b) からなる群より選択される、上記 [1] に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント：

(a) 配列番号2又は配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント及び配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント；及び

(b) 配列番号2又は配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号2又は配列番号4のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント。

[3] 以下の (a) 及び (b) からなる群より選択される、上記 [1] に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント：

(a) 配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び配列番号12に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント；及び

(b) 配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域であって、配列番号10のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント、及び、配列番号12に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント。

[4] 以下の (a) 及び (b) からなる群より選択される、上記 [3] に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント：

(a) 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント及び配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント；及び

(b) 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号4のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる

軽鎖を含む、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント。

[5] 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント及び配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、上記[4]に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント。

[6] 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号4のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、上記[4]に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント。

[7] 1以上の標識部と、上記[1]ないし[6]のいずれかに記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを含む複合体。

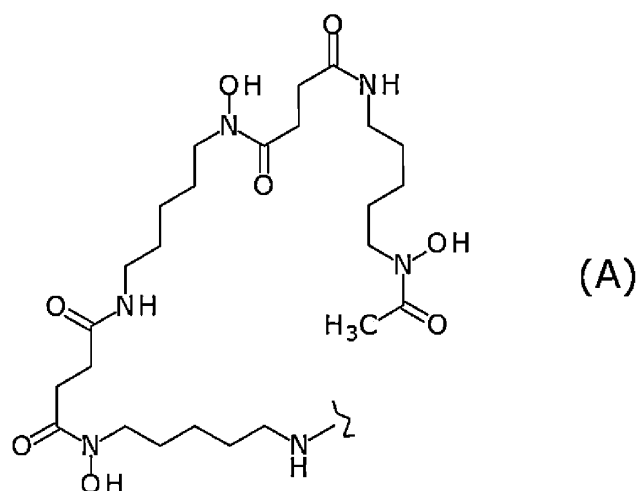
[8] 標識部が(i)配位子及びリンカー、(ii)配位子、(iii)蛍光色素及びリンカー、又は(iv)蛍光色素である、上記[7]に記載の複合体。

[9] 標識部が(i)配位子及びリンカー又は(ii)配位子である、上記[8]に記載の複合体。

[10] 配位子が、下式(A)で表される配位子である、上記[9]に記載の複合体：

[0018]

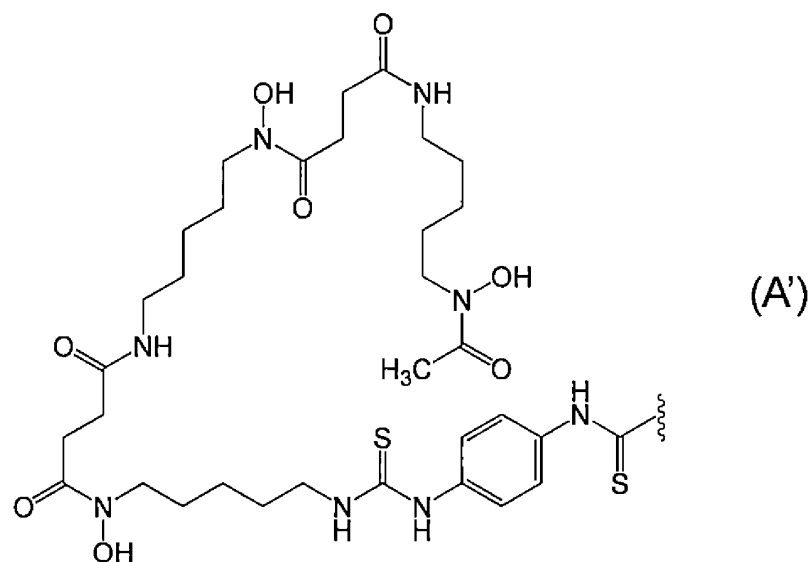
[化1]



式中、波線は抗ヒトMUC 1 抗体F a b フラグメント又はリンカーへの結合を表す。

[1 1] 標識部が、下式 (A') で表される配位子及びリンカーである、上記 [1 0] に記載の複合体 :

[0019] [化2]



式中、波線は抗ヒトMUC 1 抗体F a b フラグメントへの結合を表す。

[1 2] 抗ヒトMUC 1 抗体F a b フラグメントが、そのアミノ基を介して

、標識部末端C(=S)基の炭素原子と結合している、上記[11]に記載の複合体。

[13] 以下の(a)から(c)からなる群より選択される、複合体：

(a) 抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントが上記[5]に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、上記[12]に記載の複合体；

(b) 抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントが上記[6]に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、上記[12]に記載の複合体；並びに

(c) 上記(a)及び上記(b)の混合物である、複合体。

[14] 更に金属を含む、上記[9]ないし[13]のいずれかに記載の複合体。

[15] 金属が金属放射性同位元素である、上記[14]に記載の複合体。

[16] 金属が⁸⁹Zrである、上記[15]に記載の複合体。

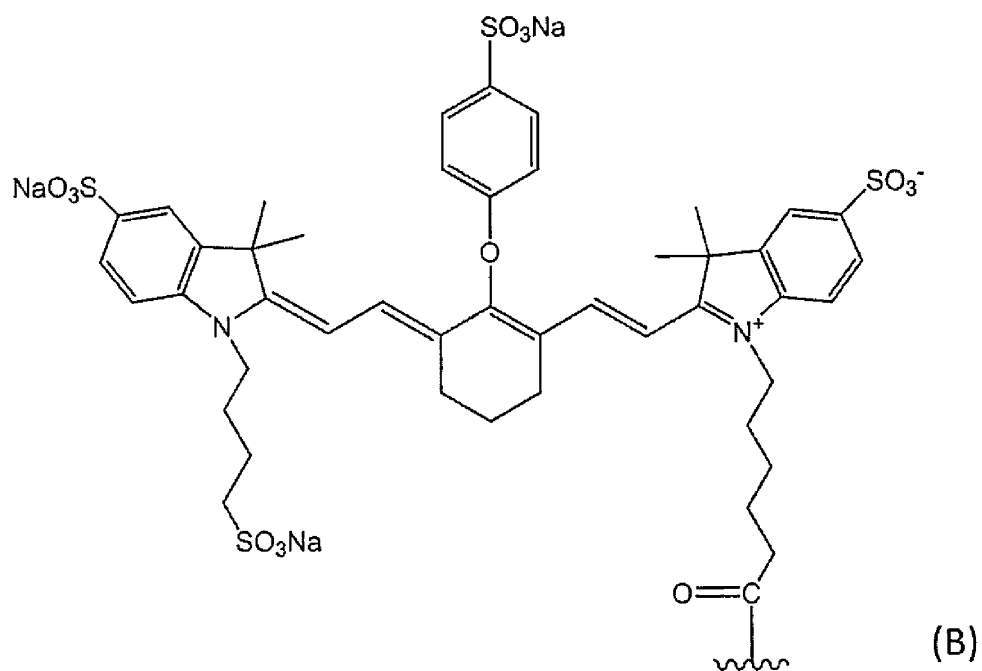
[17] 更に⁸⁹Zrを含む、上記[13]に記載の複合体。

[18] 標識部が(i)蛍光色素及びリンカー又は(ii)蛍光色素である、上記[8]に記載の複合体。

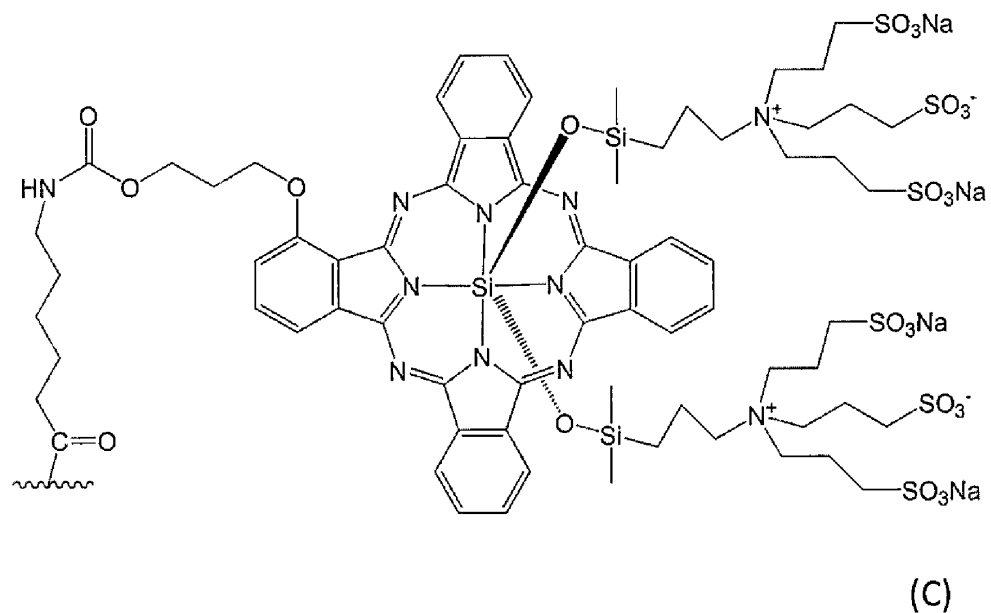
[19] 蛍光色素が下式(B)及び下式(C)からなる群より選択される蛍光色素である、上記[18]に記載の複合体：

[0020]

[化3]



[0021] [化4]



式 (B) 及び (C) 中、波線は抗ヒトMUC1 抗体Fabフラグメント又はリンカーへの結合を表す。

[20] 波線が抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントへの結合を表し、当該抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントは、そのアミノ基を介して、標識部末端C(=O)基の炭素原子と結合している、上記[19]に記載の複合体。

[21] 標識部が、式(B)で表される蛍光色素である、上記[20]に記載の複合体。

[22] 以下の(a)から(c)からなる群より選択される、複合体：

(a) 抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントが上記[5]に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである上記[21]に記載の複合体；

(b) 抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントが上記[6]に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、上記[21]に記載の複合体；並びに

(c) 上記(a)及び上記(b)の混合物である、複合体。

[23] 標識部が、式(C)で表される蛍光色素である、上記[20]に記載の複合体。

[24] 以下の(a)から(c)からなる群より選択される、複合体：

(a) 抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントが上記[5]に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、上記[23]に記載の複合体；

(b) 抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントが上記[6]に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、上記[23]に記載の複合体；並びに

(c) 上記(a)及び上記(b)の混合物である、複合体。

[25] 以下の(a)及び(b)からなる群より選択される、ポリヌクレオチド：

(a) 上記[1]に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；及び

(b) 上記[1]に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[26] 以下の (a) 及び (b) からなる群より選択される、ポリヌクレオチド：

(a) 上記 [5] に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド；及び

(b) 上記 [5] に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[27] 以下の (a) 及び／又は (b) を含む、発現ベクター：

(a) 上記 [1] に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(b) 上記 [1] に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[28] 以下の (a) 及び／又は (b) を含む、発現ベクター：

(a) 上記 [5] に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(b) 上記 [5] に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[29] 以下の (a) から (d) からなる群より選択される、宿主細胞：

(a) 上記 [1] に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(b) 上記 [1] に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(c) 上記 [1] に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び上記 [1] に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；並びに

(d) 上記 [1] に記載の抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び上記 [1] に記載の抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[30] 以下の (a) から (d) からなる群より選択される、宿主細胞：

(a) 上記 [5] に記載の抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(b) 上記 [5] に記載の抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(c) 上記 [5] に記載の抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び上記 [5] に記載の抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；並びに

(d) 上記 [5] に記載の抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び上記 [5] に記載の抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[31] 以下の (a) から (c) からなる群より選択される宿主細胞を培養し、抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントを発現させる工程を含む、抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントを生産する方法：

(a) 上記 [1] に記載の抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び上記 [1] に記載の抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列

を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(b) 上記〔1〕に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び上記〔1〕に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；並びに

(c) 上記〔1〕に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞、及び、上記〔1〕に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

〔32〕以下の(a)から(c)からなる群より選択される宿主細胞を培養し、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを発現させる工程を含む、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを生産する方法：

(a) 上記〔5〕に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び上記〔5〕に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(b) 上記〔5〕に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び上記〔5〕に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；並びに

(c) 上記〔5〕に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞、及び、上記〔5〕に記載の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

〔33〕上記〔31〕又は〔32〕に記載の方法により抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを生産する工程、及び、当該Fabフラグメントを標識部と共有結合させる工程を含む、標識部と抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを含む複合体を生産する方法。

〔34〕Fabフラグメントを標識部と共有結合させる工程が、当該Fabフラグメントをi) 配位子とリンカーを介して結合させる又はii) 配位子と直接共有結合させる工程である、上記〔33〕に記載の複合体を生産する方法。

〔35〕更に、当該複合体の配位子を金属放射性同位元素で標識させる工程を含む、上記〔34〕に記載の複合体を生産する方法。

〔36〕Fabフラグメントを標識部と共有結合させる工程が、当該Fabフラグメントをi) 蛍光色素とリンカーを介して結合させる又はii) 蛍光色素と直接共有結合させる工程である、上記〔33〕に記載の複合体を生産する方法。

〔37〕1種類以上の上記〔7〕ないし〔24〕のいずれかに記載の複合体、及び薬学的に許容される担体を含む診断用組成物。

〔38〕複合体が、上記〔17〕、〔22〕及び〔24〕のいずれかに記載の複合体である、上記〔37〕に記載の診断用組成物。

〔39〕複合体が、上記〔17〕に記載の複合体である、上記〔38〕に記載の診断用組成物。

〔40〕複合体が、上記〔22〕に記載の複合体である、上記〔38〕に記載の診断用組成物。

〔41〕複合体が、上記〔24〕に記載の複合体である、上記〔38〕に記載の診断用組成物。

〔42〕ヒトMUC1を発現する癌の診断に用いる、上記〔37〕ないし〔41〕のいずれかに記載の診断用組成物。

〔43〕癌が、乳癌又は膀胱癌である、上記〔42〕に記載の診断用組成物。

〔４４〕１種類以上の上記〔７〕ないし〔２４〕のいずれかに記載の複合体及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

〔４５〕複合体が、上記〔１７〕、〔２２〕及び〔２４〕のいずれかに記載の複合体である、上記〔４４〕に記載の医薬組成物。

〔４６〕複合体が、上記〔２４〕に記載の複合体である、上記〔４５〕に記載の医薬組成物。

〔４７〕ヒトMUC１を発現する癌を治療するための医薬組成物である、上記〔４４〕ないし〔４６〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔４８〕癌が、乳癌又は膀胱癌である、上記〔４７〕に記載の医薬組成物。

〔４９〕乳癌又は膀胱癌の診断用組成物及び/又は乳癌又は膀胱癌を治療するための医薬組成物の製造のための、上記〔７〕ないし〔２４〕のいずれかに記載の複合体の使用。

〔５０〕乳癌又は膀胱癌の診断及び/又は治療において使用するための、上記〔７〕ないし〔２４〕のいずれかに記載の複合体。

〔５１〕上記〔７〕ないし〔２４〕のいずれかに記載の複合体を手術前又は手術中に対象に投与することを含む、乳癌又は膀胱癌の診断方法。

〔５２〕上記〔７〕ないし〔２４〕のいずれかに記載の複合体の治療有効量を投与する工程を含む、乳癌又は膀胱癌の治療方法。

発明の効果

[0022] 本発明の抗ヒトMUC１抗体Fabフラグメントは、ヒト癌特異的MUC１に対する優れた結合活性を有し、乳癌等の癌の診断及び/又は治療に有用であることが期待される。

図面の簡単な説明

[0023] [図1]図１は、P10-1 Fab、P10-2 Fab及び比較例である1B2 Fabのヒト癌特異的MUC１に対する結合活性を示すグラフ及び表である。

[図2]図２は、P10-1 Fab-Dye、P10-2 Fab-Dye及び比較例である1B2 Fab-Dyeのヒト癌特異的MUC１に対する結

合活性を示すグラフ及び表である。

[図3]図3は、P10-2 Fab DFO及びP10-2 Fabのヒト癌特異的MUC1に対する結合活性を示すグラフ及び表である。

[図4]図4は、P10-2 Fabのヒト癌特異的MUC1を発現する乳癌細胞株MDA-MB-468細胞（MM-468細胞とも称する）及び膀胱癌細胞株647-V細胞に対する結合活性を示すグラフである。横軸は、P10-2 Fabの濃度（Log（mg/mL））を、縦軸は発光量（Luminescence）を示す。

[図5A]図5Aは、皮下担癌モデルにP10-2 Fab Dyeを3mg/kg静脈投与し、投与6時間後に通常のカメラ（左）、及び近赤外蛍光カメラ（中央、右）で撮像した代表的な写真である。

[図5B]図5Bは、腫瘍部分（Tumor）及び腫瘍周囲の正常部分（Background）の蛍光輝度比（Tumor/Background Ratio）を定量化したグラフであり、平均値+標準誤差を表す。横軸は、P10-2 Fab Dyeの投与量及び投与後の時間を示す。

[図6]図6は、MM-468細胞を移植したマウスにP10-2 Fab IR700を投与し、投与2時間後に動物を安楽死させ、腫瘍を摘出し、IVIS SPECTRUMで撮像し、腫瘍部分の発光量を測定した結果を示すグラフである。縦軸は、発光量を示す。

[図7]図7は、MM-468細胞、647-V細胞又は比較例であるCHO-K1細胞に対して、P10-2 Fab IR700を反応させた後、光照射を行い、細胞障害性を測定した結果を示すグラフである。各グラフの横軸は上段がP10-2 Fab IR700の濃度を、下段が光照射量を、それぞれ示す。縦軸は発光量であり、平均値+標準誤差を表す。

[図8]図8は、MM-468細胞を移植したヌードマウスを用いて、P10-2 Fab IR700投与時の光照射の有無（0J又は200J）による、抗腫瘍効果を測定した結果を示すグラフである。横軸は、腫瘍体積が300mm³になった日を1日としたときの日数（days）を示す。縦軸は腫瘍

体積 (volume (mm³)) であり、平均値+標準誤差を示す。

発明を実施するための形態

- [0024] 以下に、本発明について詳述するが、本発明はこれらに限定されるものではない。本明細書で特段に定義されない限り、本発明に関連して用いられる科学用語及び技術用語は、当業者によって一般に理解される意味を有するものとする。
- [0025] 本発明者らは、抗ヒト癌特異的MUC1抗体又はその抗原結合フラグメントの作製において相当の創意検討を重ねた結果、癌特異的MUC1への強い結合能を有した抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを作製することに成功した。
- [0026] 抗体分子の基本構造は、各クラス共通で、分子量5万～7万の重鎖と2～3万の軽鎖から構成される。重鎖は、通常約440個のアミノ酸を含むポリペプチド鎖からなり、クラスごとに特徴的な構造をもち、IgG、IgM、IgA、IgD、IgEに対応して γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ 鎖とよばれる。さらにIgGには、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4が存在し、それぞれ γ 1、 γ 2、 γ 3、 γ 4とよばれている。軽鎖は、通常約220個のアミノ酸を含むポリペプチド鎖からなり、L型とK型の2種が知られており、それぞれ λ 、 κ 鎖とよばれる。抗体分子の基本構造のペプチド構成は、それぞれ相同な2本の重鎖及び2本の軽鎖が、ジスルフィド結合(S-S結合)及び非共有結合によって結合され、分子量15万～19万である。2種の軽鎖は、どの重鎖とも対をなすことができる。個々の抗体分子は、常に同一の軽鎖2本と同一の重鎖2本からできている。
- [0027] 鎖内S-S結合は、重鎖に四つ(μ 、 ϵ 鎖には五つ)、軽鎖には二つあって、アミノ酸100～110残基ごとに一つのループを成し、この立体構造は各ループ間で類似していて、構造単位あるいはドメインとよばれる。重鎖、軽鎖ともにN末端に位置するドメインは、同種動物の同一クラス(サブクラス)からの標品であっても、そのアミノ酸配列が一定せず、可変領域とよばれており、各ドメインは、それぞれ、重鎖可変領域(VHドメイン)及び

軽鎖可変領域（V L ドメイン）とよばれている。これよりC末端側のアミノ酸配列は、各クラスあるいはサブクラスごとにほぼ一定で定常領域とよばれており、各ドメインは、それぞれ、C H 1、C H 2、C H 3あるいはC L と表される。

[0028] 抗体と抗原との結合の特異性は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域によって構成される部分のアミノ酸配列によっている。一方、補体や各種細胞との結合といった生物学的活性は各クラス I g の定常領域の構造の差を反映している。重鎖と軽鎖の可変領域の可変性は、どちらの鎖にも存在する3つの小さな超可変領域にほぼ限られることがわかっており、これらの領域を相補性決定領域（C D R；それぞれN末端側からC D R 1、C D R 2、C D R 3）とよんでいる。可変領域の残りの部分はフレームワーク領域（F R）とよばれ、比較的一定である。

[0029] 抗体の重鎖定常領域のC H 1 ドメインとC H 2 ドメインとの間にある領域はヒンジ領域とよばれ、この領域は、プロリン残基を多く含み、2本の重鎖をつなぐ複数の鎖間S－S結合を含む。例えば、ヒトのI g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4の各ヒンジ領域には、重鎖間のS－S結合を構成している、それぞれ、2個、4個、11個、2個のシステイン残基を含む。ヒンジ領域は、パパインやペプシン等のタンパク質分解酵素に対する感受性が高い領域である。抗体をパパインで消化した場合、ヒンジ領域の重鎖間S－S結合よりもN末端側の位置で重鎖が切断され、2個のF a bフラグメントと1個のF cフラグメントに分解される。F a bフラグメントは、軽鎖と、重鎖可変領域、C H 1 ドメインとヒンジ領域の一部とを含む重鎖フラグメントから構成される。F a bフラグメントは可変領域を含み、抗原結合活性を有する。

[0030] <本発明の抗ヒトMUC 1抗体F a bフラグメント>

本発明の抗ヒトMUC 1抗体F a bフラグメントは、以下の特徴を有するF a bフラグメントである：

配列番号8又は配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領

域を含む重鎖フラグメント及び配列番号 12 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む抗ヒト MUC 1 抗体 F a b フラグメント。

[0031] 1つの実施形態において、本発明の抗ヒト MUC 1 抗体 F a b フラグメントは、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び配列番号 12 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む抗ヒト MUC 1 抗体 F a b フラグメントである。

[0032] 本発明の抗ヒト MUC 1 抗体 F a b フラグメントの重鎖定常領域としては、I g γ 1、I g γ 2、I g γ 3 又は I g γ 4 等のいずれの定常領域も選択可能であり得る。1つの実施形態において、本発明の抗ヒト MUC 1 抗体 F a b フラグメントの重鎖定常領域は、ヒト I g γ 1 定常領域である。

[0033] 本発明の抗ヒト MUC 1 抗体 F a b フラグメントの軽鎖定常領域としては、I g λ 又は I g κ のいずれの定常領域も選択可能であり得る。1つの実施形態において、本発明の抗ヒト MUC 1 抗体 F a b フラグメントの軽鎖定常領域は、ヒト I g κ 定常領域である。

[0034] 1つの実施形態において、本発明の抗ヒト MUC 1 抗体 F a b フラグメントは、以下の F a b フラグメントである：

配列番号 2 又は配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント及び配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒト MUC 1 抗体 F a b フラグメント。

[0035] 1つの実施形態において、本発明の抗ヒト MUC 1 抗体 F a b フラグメントは、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント及び配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒト MUC 1 抗体 F a b フラグメントである。

[0036] F a b フラグメントを含め、抗体を細胞で発現させる場合、抗体が翻訳後に修飾を受けることが知られている。翻訳後修飾の例としては、重鎖 C 末端のリジンのカルボキシペプチダーゼによる切断、重鎖及び軽鎖 N 末端のグルタミン又はグルタミン酸のピログルタミル化によるピログルタミン酸への修飾、グリコシル化、酸化、脱アミド化、糖化等が挙げられ、種々の抗体にお

いて、このような翻訳後修飾が生じることが知られている（J. Pharm. Sci., 2008; 97: 2426-47.）。

[0037] 本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントには、翻訳後修飾により生じたFabフラグメントも含まれ得る。翻訳後修飾により生じ得る本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの例としては、重鎖N末端のピログルタミル化した抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントが挙げられる。このようなN末端のピログルタミル化による翻訳後修飾は、抗体の活性に影響を及ぼすものではないことは当該分野で知られている（Anal. Biochem., 2006; 348: 24-39）。

[0038] 1つの実施形態において、本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントは、下記の特徴を有する抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである：配列番号8又は配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域であって、配列番号8又は配列番号10のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント、及び、配列番号12に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント。

[0039] ある実施形態において、本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントは、下記の特徴を有する抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである：配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域であって、配列番号10のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント、及び、配列番号12に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント。

[0040] 別の実施形態において、本発明の抗MUC1抗体Fabフラグメントは、下記の特徴を有する抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである：配列番号2又は配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号2又は配列番号4のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号6に示され

るアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメント。

[0041] ある実施形態において、本発明の抗MUC 1 抗体F a bフラグメントは、下記の特徴を有する抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントである：

配列番号4 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号4 のアミノ酸番号1 のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号6 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメント。

[0042] 本発明の抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントは、ヒト癌特異的MUC 1 に結合する。癌特異的MUC 1 は、乳癌、肺癌、大腸癌、膀胱癌、皮膚癌、甲状腺癌、胃癌、膵臓癌、腎臓癌、卵巣癌又は子宮頸癌等の癌において発現している。得られた抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントのヒト癌特異的MUC 1 に対する結合活性を測定する方法としては、ELISAやFACS等の方法がある。例えば、ELISAを用いる場合、ヒト癌特異的MUC 1 陽性細胞（例えば、T-47D細胞）をELISAプレートに固定化し、これに対してF a bフラグメントを添加して反応させた後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ等で標識した抗IgG抗体等を反応させた後、その活性を検出する試薬（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識の場合、化学発光ホースラディッシュペルオキシダーゼ基質）等を用いた活性測定により、二次抗体の結合を同定する。

[0043] 本発明の抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントは、本明細書に開示される、本発明の抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントの重鎖フラグメント及び軽鎖の配列情報に基づいて、当該分野で公知の方法を使用して、当業者によって容易に作製され得る。本発明の抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントは、特に限定されるものではないが、例えば、後述の＜本発明の抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントを生産する方法＞に記載の方法に従い製造することができる。

[0044] ＜本発明の複合体＞

本発明の複合体は、標識部と本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを含む複合体である。

- [0045] 「標識部」とは、(i) 配位子及びリンカー、(ii) 配位子、(iii) 蛍光色素及びリンカー、又は(iv) 蛍光色素、である。ある態様としては、(i) 配位子及びリンカー、又は(ii) 配位子が挙げられる。ある態様としては、(i) 蛍光色素及びリンカー、又は(ii) 蛍光色素が挙げられる。「標識部」の配位子は更に金属を含んでもよく、ある態様としては、金属を含む(i) 配位子及びリンカー又は(ii) 配位子であり、言い換えると、(i) 金属とキレート錯体を形成した配位子及びリンカー、又は、(ii) 金属とキレート錯体を形成した配位子である。
- [0046] 金属又は蛍光色素を含む本発明の複合体は、各種造影剤及び／又は癌の治療剤に用いることができ、例えば、MRI造影剤、PETトレーサー、蛍光標識された分子イメージング剤、光免疫療法に使用される薬剤等に用いられる。
- [0047] 本明細書において、「金属」は、常磁性金属イオン又は金属放射性同位元素を意味する。
- [0048] 常磁性金属イオンはMRI造影剤に好適に用いられる。常磁性金属イオンの態様としては、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Rh^{2+} 、 Co^{2+} 、 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+} 、又は Mn^{2+} が挙げられるが、これらに限定されない。ある態様としては、 Gd^{3+} 、 Mn^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、又は Fe^{3+} が挙げられる。ある態様としては、 Mn^{3+} 又は Mn^{2+} が挙げられる。この場合、複合体にはカウンターアニオンとしてハロゲン等用いることができる。また、カウンターアニオンは配位子の $\text{C}(=\text{O})\text{O}^-$ であってもよく、さらに複合体は、 Na^+ などのカウンターカチオンを有していてもよい。
- [0049] 金属放射性同位元素は、例えば、PETトレーサー等に用いられる。ある態様としては、 ^{89}Zr 、 ^{51}Mn 、 ^{52}Fe 、 ^{60}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As

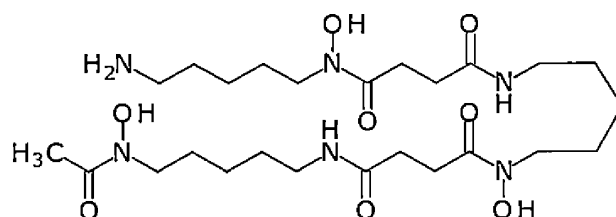
s、 ^{99m}Tc 、又は ^{111}In が挙げられるが、これらに限定されない。ある態様としては、 ^{89}Zr 、 ^{60}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{99m}Tc 、又は ^{111}In が挙げられる。ある態様としては、ジルコニウムの放射同位体が挙げられる。ある態様としては ^{89}Zr が挙げられる。

[0050] 「配位子」とは、複合体において、金属とキレート錯体を形成しうる部分であり、キレート剤から構成される基を意味する。構成される基とは、キレート剤からプロトンが除かれて、結合手を有する基である。

[0051] 「キレート剤」とは、金属と配位結合できる化合物である。

[0052] 「キレート剤」としては、シデロホアと、非シデロホアが挙げられる。シデロホアとしては、ヒドロキサム酸型、カテコール型、又は、混合配位子型が挙げられる。ヒドロキサム酸型シデロホアとしては、例えば、フェリクローム、下式：

[0053] [化5]



で表されるデフェロキサミン（DFO）、フサリニンC、オルニバクチン、ロドトルル酸が挙げられる。カテコール型シデロホアとしては、例えば、エンテロバクチン、バチリバクチン、ピブリオバクチンが挙げられる。混合配位子型シデロホアとしては、例えば、アゾトバクチン、ピヨベルジン、エルシニアバクチンが挙げられる。なお、上記シデロホアの場合、DFOはその反応性官能基である $-\text{NH}_2$ を介してリンカー又はFabフラグメントと反応させることができ、DFO以外のシデロホアの場合には、カルボキシ基、水酸基、アミノ基等の反応性官能基を介して、当業者が通常用いる方法でリンカー又はFabフラグメントと反応させることもできる。

[0054] 非シデロホアとしては、DTPA（ジエチレントリアミン五酢酸、CAS

番号：67-43-6）、DTPA-BMA（1，7-ビス（メチルカルバモイルメチル）-1，4，7-トリアザヘプタン-1，4，7-三酢酸、CAS番号：119895-95-3）、EOB-DTPA（エトキシベンジル基が結合したDTPA、CAS番号：158599-72-5）、TTHA（トリエチレンテトラミン六酢酸、CAS番号：869-52-3）、DO3A（1，4，7，10-テトラアザシクロドデカン-1，4，7-三酢酸、CAS番号：217973-03-0）、HP-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、CAS番号：120041-08-9）、DOTA（1，4，7，10-テトラアザシクロドデカン-1，4，7，10-テトラ酢酸、CAS番号：60239-18-1）、及びこれらの公知の反応性誘導体が挙げられる。

[0055] なお、本明細書中の化合物及び複合体は、特に記載がない限りフリー体及びその塩も包含する。ここに「その塩」とは、その化合物及び複合体の置換基の種類によって、酸付加塩又は塩基との塩を形成する場合があり、その化合物及び複合体が形成しうる塩である。具体的には、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の無機酸や、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、乳酸、リンゴ酸、マンデル酸、酒石酸、ジベンゾイル酒石酸、ジトルオイル酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸等の有機酸との酸付加塩、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、アルミニウム等の無機塩基、メチルアミン、エチルアミン、エタノールアミン、リシン、オルニチン等の有機塩基との塩、アセチルロイシン等の各種アミノ酸及びアミノ酸誘導体との塩やアンモニウム塩等が挙げられる。例えば、DFOは、デフェロキサミンメタンスルホン酸塩としても存在し、他の塩としても存在する。DTPAは、フリー体とともにナトリウム塩としても存在する。

[0056] MRI造影剤に用いる「キレート剤」のある態様としては、上記のシデロ

ホア及び非シデロホアキレート剤である。

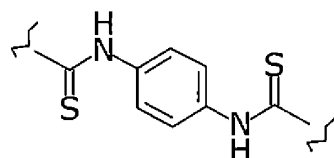
[0057] PETトレーサーに用いる「キレート剤」のある態様としては、上記のシデロホア及び非シデロホアキレート剤であり、更に、ある態様としては、MAG3（メルカプト－アセチル－グリシン－グリシン－グリシン、CAS番号：66516-09-4）である。ある態様としては、DFOである。

[0058] 本発明の複合体に含まれる配位子を形成する「キレート剤」のある態様としては、DFO、DTPA、DTPA-BMA、EOB-DTPA、DO3A、HP-DO3A、DOTAが挙げられる。ある態様としては、DFO、DTPA、DOTAが挙げられる。ある態様としては、DFOが挙げられる。

[0059] 「リンカー」とは、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントと配位子の間に距離をつくる基である。複合体における「リンカー」のある態様としては、

下式：

[0060] [化6]



（以下、 $-C(=S)-NH-(1,4\text{-フェニレン})-NH-C(=S)-$ と表記する）、 $-CH_2-(1,4\text{-フェニレン})-NH-C(=S)-$ 、 $-C(=O)-(C_{1-20}\text{ アルキレン})-C(=O)-$ 、が挙げられる。ここで「 C_{1-20} アルキレン」とは、直鎖又は分岐の炭素数1～20のアルキレンである。 C_{1-20} アルキレンのある態様としては、 C_{1-10} アルキレン、 C_{1-2} アルキレンが挙げられる。 C_{1-20} アルキレンのある態様としては、エチレンが挙げられる。ある態様としては、 $-C(=S)-NH-(1,4\text{-フェニレン})-NH-C(=S)-$ が挙げられる。ある態様としては、 $-C(=O)-C_2H_4-C(=O)-$ が挙げられる。リンカーとして用いることがで

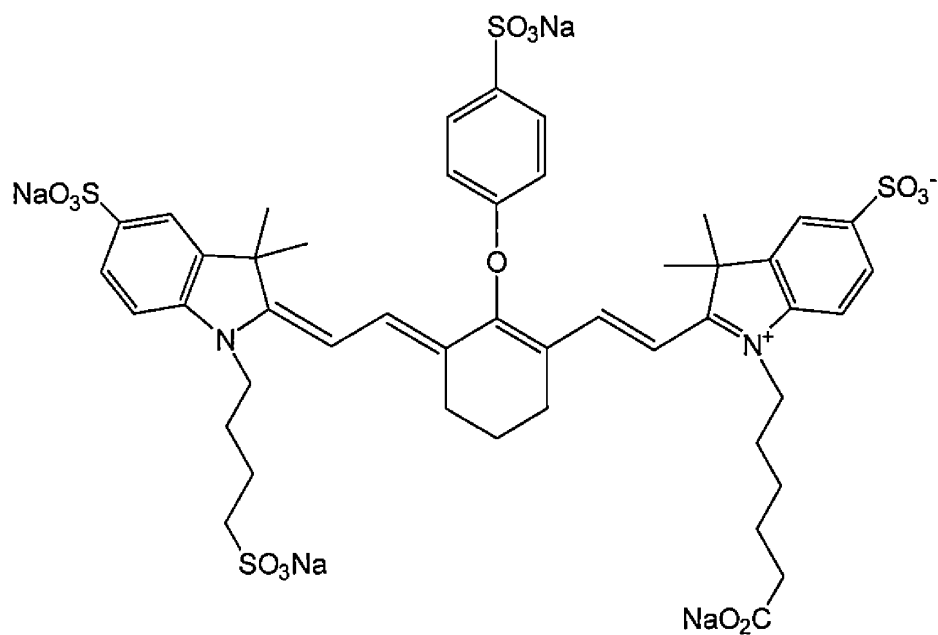
きる試薬としては、 $\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-(\text{C}_{1-20} \text{ アルキレン})-\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$ 、コハク酸、 p -ジNCS-ベンゼン (p -ジイソチオシアノベンゼン) 等が挙げられる。

[0061] 蛍光色素を含む本発明の複合体は、蛍光標識された分子イメージング剤、光免疫療法に使用される薬剤、又は蛍光標識された分子イメージング剤及び光免疫療法に使用される薬剤として用いることができる。

[0062] 本発明の複合体に用いる蛍光色素としては、光イメージングに通常用いられる近赤外波長(650~1000nm)に吸収極大及び発光極大がある色素を用いることができる。蛍光色素のある態様としては、シアニン又はインドシアニン化合物が挙げられる。ある態様としては、IRDye800CW、及びIRDye700DX (LI-COR Biosciences社)、Cy(Molecular Probe社)、Alexa Fluor、BODIPY、及びDyLight (Thermo Fisher Scientific社)、CF790 (Biotium社)、DY (DYOMIC S GMBH社)、HiLyte Fluor680、及びHiLyte Fluor750 (Anaspec社)、PULSAR650、及びQUASAR670 (Biosearch Technologies社)等が挙げられる。ある態様としては、以下の式で表されるIRDye800CW

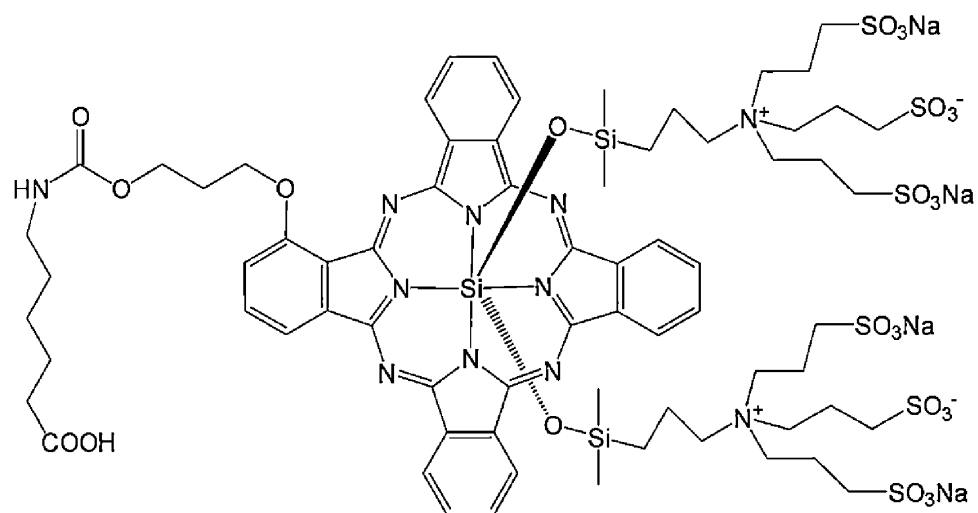
[0063]

[化7]



及び以下の式で表される I R D y e 7 0 0 D X

[0064] [化8]



が挙げられる。なお、蛍光色素は、そのカルボキシ基、水酸基、アミノ基等を介して、あるいは当業者が通常用いる方法で活性化基を導入し、F a b フラグメントあるいはリンカーと反応させることができる。活性化基が導入さ

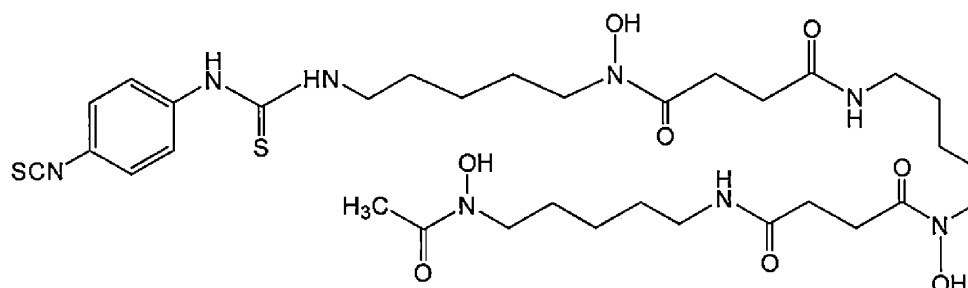
れた蛍光色素のある態様としては、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）基でエステル化された蛍光色素が挙げられる。例えば、上述のIRDye 800CW及びIRDye 700DXのNHSエステルは市販されており、それらを利用可能である。

[0065] 本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントと、標識部との結合は、公知の手法により、当業者が適宜行うことができる。例えば、標識部を本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの1以上のアミノ基（例えば、N末端アミノ基やアミノ酸側鎖のアミノ基）、1以上のチオール基（例えば、アミノ酸側鎖のチオール基）、又は1以上のカルボキシル基（例えば、C末端アミノ酸の側鎖のカルボキシル基）に結合させることができる。ある態様として、本発明の複合体は、標識部が本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの1以上のアミノ基に結合した、複合体である。

[0066] 本発明の複合体は、標識部が配位子及びリンカーである場合、本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントとリンカーを反応させて得られた物質にキレート剤を反応させて製造することもできる。キレート剤にリンカーを反応させて得られた物質に本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを反応させて製造することもできる。反応例としては、キレート剤のアミノ基とリンカーとを反応させ得られた物質を、本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの1以上のアミノ基（例えば、N末端アミノ基やリジン側鎖のアミノ基）と反応させることもできる。複合体の製造には、アミンにイソチオシアネートを加えてチオウレアを合成する反応や、アミンとカルボン酸を加えてアミドを合成する反応等を用いることができる。反応は、当業者に公知の方法を適用することにより行うことができる。なお、原料としてあらかじめキレート剤とリンカーが結合した化合物を用いることもできる。キレート剤とリンカーが結合した化合物の例としては、以下の式で表されるp-SCN-Bn-DFO（p-イソチオシアノフェニルアミノチオカルボニル基が結合したDFO、CAS番号：1222468-90-7）、

[0067]

[化9]



p-イソチオシアノベンジル基が結合したDTPA（p-NCS-Bn-DTPA、CAS番号：102650-30-6）、p-イソチオシアノベンジル基が結合したDOTA（p-NCS-Bn-DOTA、CAS番号：127985-74-4）、及び、p-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA（〔（R）-2-アミノ-3-（4-イソチオシアナートフェニル）プロピル〕-トランス-（S，S）-シクロヘキサン-1，2-ジアミン-五酢酸、CAS番号：157380-45-5）が挙げられる。

[0068] 上記製造方法により製造した、1以上の標識部が結合した本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントに金属（常磁性金属イオン又は金属放射性同位元素）を添加し、金属を含む本発明の複合体を得ることができる。

[0069] また、本発明の複合体は、Fabフラグメントの1以上のアミノ基（例えば、N末端アミノ基やアミノ酸の側鎖のアミノ基）と、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）で活性化されたカルボキシル基やイソチオシアン酸基を有する標識部とを反応させて、アミノ基を介して1以上の標識部が結合したFabフラグメントである複合体を製造することもできる。

[0070] 本発明の複合体は、1以上の標識部と、本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを含む複合体である。ある態様としては、1～27の標識部と結合した、ある態様としては、1～23の標識部と結合した、ある態様としては1～15の標識部と結合した、ある態様としては1～11の標識部と結合した、ある態様としては1～9の標識部と結合した、ある態様としては1～7の標識部と結合した、ある態様としては1～5の標識部と結合した、

更に、ある態様としては1～4の標識部と結合した、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである。ある態様としては、更に金属を含む、1つ以上の標識部と結合した抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである。

[0071] 一つの実施形態として、本発明の複合体は、標識部が(i)配位子及びリンカー、(ii)配位子、(iii)蛍光色素及びリンカー、又は(iv)蛍光色素である複合体である。

[0072] 本発明の複合体のある実施形態としては、以下のものが挙げられる：

(1) 抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントが、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び配列番号12に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、複合体。

(2) 抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントが、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント及び配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、(1)の複合体。

(3) 抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントが、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域であって、配列番号10のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント、及び、配列番号12に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、複合体。

(4) 抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントが、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号4のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、(2)の複合体。

(5) 標識部が(i)配位子及びリンカー、又は(ii)配位子である、(1)ないし(4)のいずれかの複合体。

(6) 配位子が DFO、DTPA、DTPA-BMA、EOB-DTPA、DO3A、HP-DO3A 及び DOTA からなる群より選択されるキレート剤から構成される基であり、リンカーが、 $-C(=S)-NH-(1,4\text{-フェニレン})-NH-C(=S)-$ 、 $-CH_2-(1,4\text{-フェニレン})-NH-C(=S)-$ 及び $-C(=O)-(C_{1-20}\text{ アルキレン})-C(=O)-$ からなる群より選択されるリンカーである、(1) ないし (4) のいずれかの複合体。

(7) 配位子が DFO、DTPA、及び DOTA からなる群より選択されるキレート剤から構成される基である、(6) の複合体。

(8) 配位子が DFO から構成される基であり、リンカーが、 $-C(=S)-NH-(1,4\text{-フェニレン})-NH-C(=S)-$ である、(6) の複合体。

(9) 更に金属を含む、(5) ないし (8) のいずれかの複合体。

(10) 金属が金属放射性同位元素である、(9) の複合体。

(11) 金属が ^{89}Zr である、(10) の複合体。

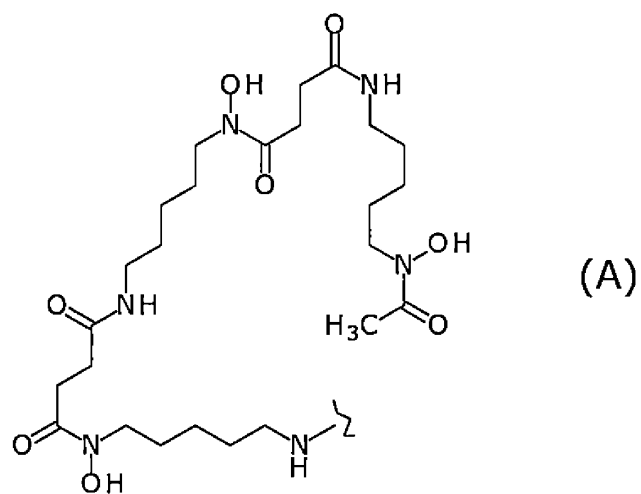
[0073] ある実施形態として、本発明の複合体は、標識部が (i) 配位子及びリンカー、又は (ii) 配位子である、複合体である。

[0074] ある実施形態として、本発明の複合体は、

配位子が下式 (A) で表される配位子である、複合体である：

[0075]

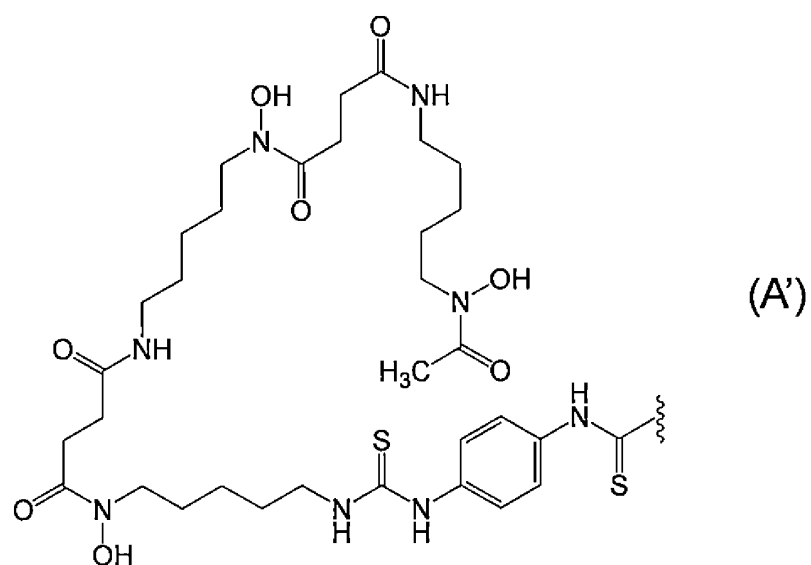
[化10]



式中、波線は抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント又はリンカーへの結合を表す。

[0076] 配位子が式(A)で表される配位子である本発明の複合体のある実施形態としては、
標識部が、下式(A')で表される配位子及びリンカーである、複合体である：

[0077] [化11]



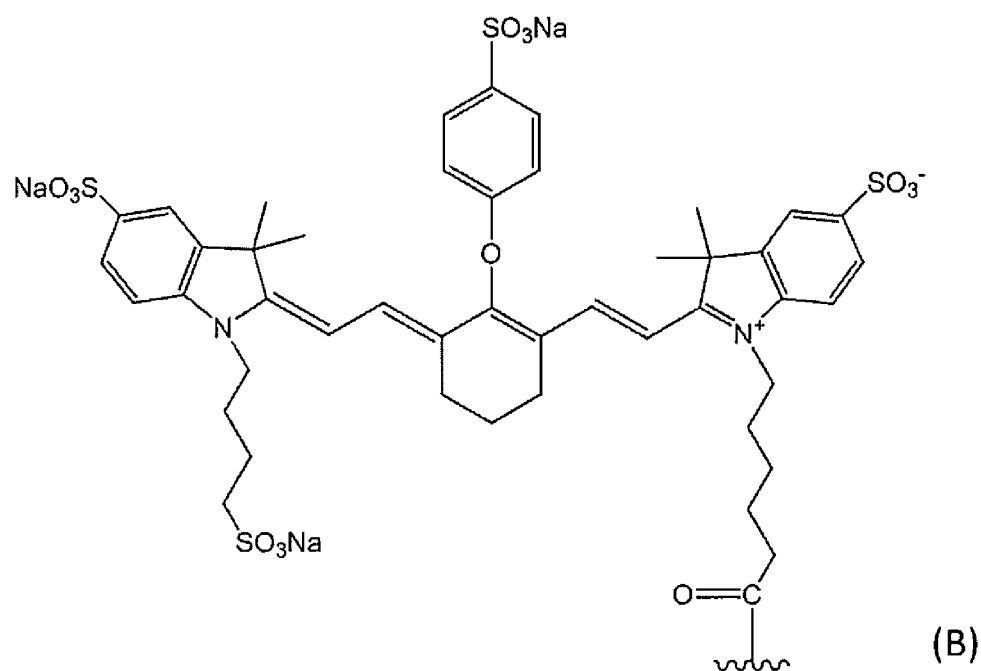
式中、波線は、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントへの結合を表し、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントはそのアミノ基を介して、標識部末端C(=S)基の炭素原子と結合している。

[0078] ある実施形態として、本発明の複合体は、標識部が(i)配位子及びリンカー、又は(ii)配位子である複合体であって、更に金属を含む複合体である。金属のある態様としては、金属放射性同位元素が挙げられる。金属放射性同位元素のある態様としては、 ^{89}Zr が挙げられる。

[0079] また別の実施形態として、本発明の複合体は、標識部が(i)蛍光色素及びリンカー、又は(ii)蛍光色素である、複合体である。

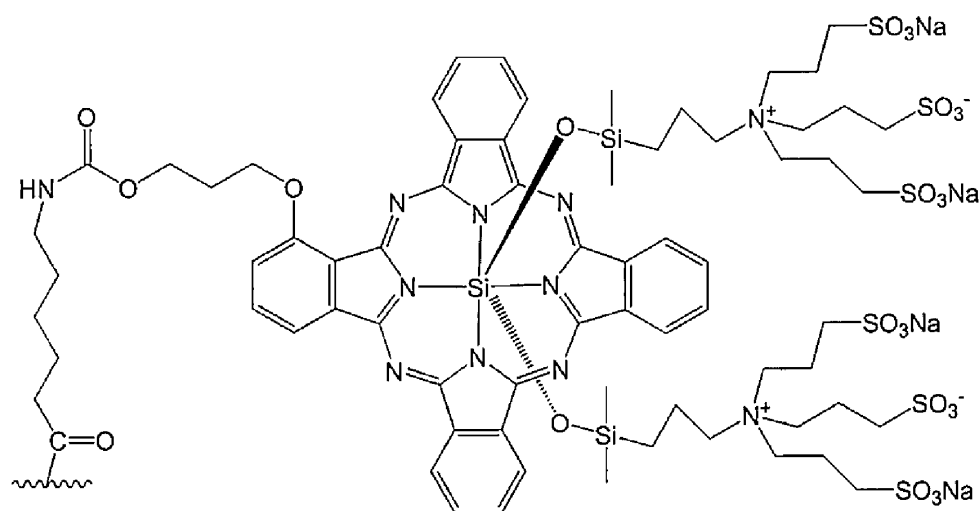
[0080] 標識部に蛍光色素を含む本発明の複合体のある実施形態としては、蛍光色素が下式(B)及び下式(C)からなる群から選択される蛍光色素である、複合体である：

[0081] [化12]



[0082]

[化13]



(C)

式 (B) 及び (C) 中、波線は抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント又はリンカーへの結合を表す。

[0083] 標識部が式 (B) で表される蛍光色素である本発明の複合体のある実施形態としては、式中、波線が、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントへの結合を表し、当該抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントがそのアミノ基を介して、標識部末端C(=O)基の炭素原子と結合している、複合体である。

[0084] 標識部が式 (C) で表される蛍光色素である本発明の複合体のある実施形態としては、式中、波線が、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントへの結合を表し、当該抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントがそのアミノ基を介して、標識部末端C(=O)基の炭素原子と結合している、複合体である。

[0085] さらに、本発明の複合体のある実施形態を以下に示す：

(1) 標識部が式 (A') で表される配位子及びリンカーであり、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントが、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び配列番号12に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、複合体。

(2) 抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントが、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント及び配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、(1)の複合体。

(3) 標識部が式(A')で表される配位子及びリンカーであり、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントが、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域であって、配列番号10のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント、及び、配列番号12に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、複合体。

(4) 抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントが、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号4のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、(3)の複合体。

(5) 1～11の標識部と結合した抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、(2)又は(4)の複合体。

(6) 1～4の標識部と結合した抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、(2)又は(4)の複合体。

(7) 更に金属を含む、(1)ないし(6)のいずれかの複合体。

(8) 金属が金属放射性同位元素である、(7)の複合体。

(9) 金属が ^{89}Zr である、(8)の複合体。

(10) 標識部が式(B)又は式(C)で表される蛍光色素であり、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントが、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント及び配列番号12に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、複合体。

(11) 抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントが、配列番号4に示される

アミノ酸配列からなる重鎖フラグメント及び配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、(10)の複合体。

(12) 標識部が式(B)又は式(C)で表される蛍光色素であり、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントが、配列番号10に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域であって、配列番号10のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖可変領域を含む重鎖フラグメント、及び、配列番号12に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、複合体。

(13) 抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントが、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号4のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、(12)の複合体。

(14) 標識部が式(C)で表される蛍光色素である、(10)ないし(13)のいずれかの複合体。

(15) 1～11の標識部と結合した抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、(14)の複合体。

(16) 1～5の標識部と結合した抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、(15)の複合体。

(17) 標識部が式(B)で表される蛍光色素である、(10)ないし(13)のいずれかの複合体。

(18) 1～11の標識部と結合した抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、(17)の複合体。

(19) 1～5の標識部と結合した抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである、(18)の複合体。

[0086] 別の実施形態として、本発明の複合体は、下式(I)で表される、複合体である：

[0087] [化14]



式中、Abは抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを表し、

Lは(i)配位子、又は(ii)蛍光色素を表し、

Xはリンカー又は結合を表し、

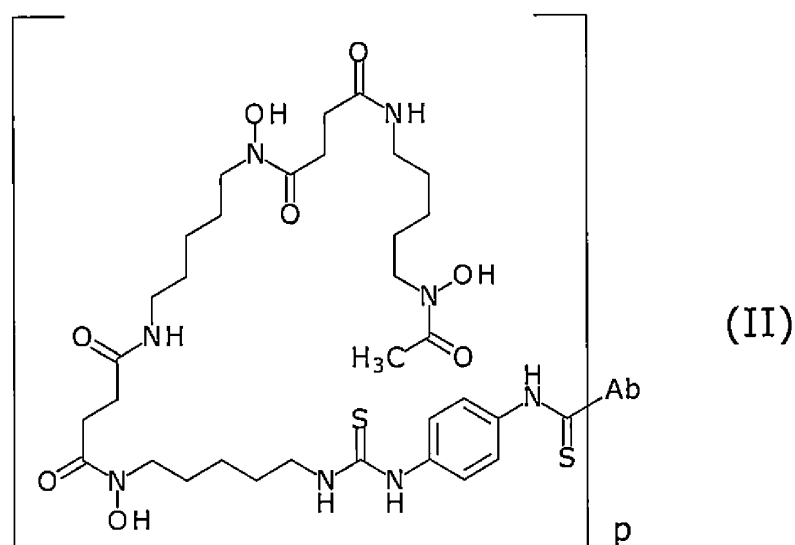
pは1～27の自然数であり、pのある態様としては1～23の自然数であり、ある態様としては1～15の自然数であり、ある態様としては1～11の自然数であり、ある態様としては1～9の自然数であり、ある態様としては1～7の自然数であり、ある態様としては1～5の自然数であり、更に、ある態様としては1～4の自然数である。

[0088] ある実施形態として、本発明の複合体は、式(I)の複合体であって、更に金属を含む複合体である。金属のある態様としては、金属放射性同位元素が挙げられる。金属放射性同位元素のある態様としては、 ^{89}Zr が挙げられる。

[0089] 式(I)の複合体のある実施形態としては、標識部が、式(A')で表される配位子及びリンカーである本発明の複合体が挙げられ、当該複合体のある実施形態としては、
下式(II)で表される複合体である：

[0090]

[化15]



式中、Abは、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを表し、

pは1～27の自然数であり、pのある態様としては1～23の自然数であり、ある態様としては1～15の自然数であり、ある態様としては1～11の自然数であり、ある態様としては1～9の自然数であり、ある態様としては1～7の自然数であり、ある態様としては1～5の自然数であり、更に、ある態様としては1～4の自然数であり、

Abはそのアミノ基を介して、標識部末端C(=S)基の炭素原子と結合している。

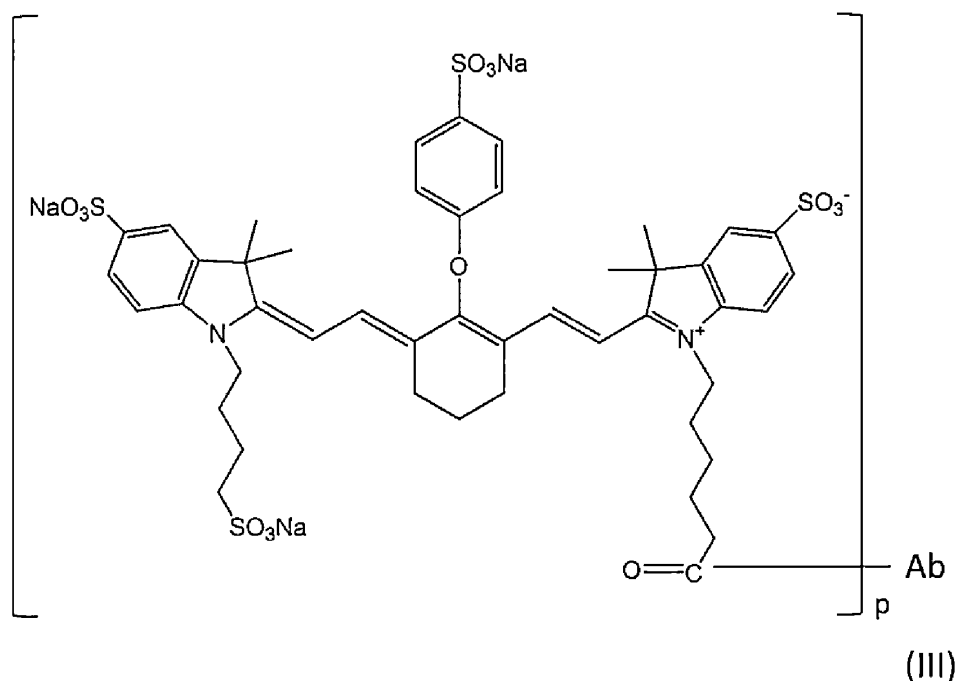
[0091] ある実施形態として、本発明の複合体は、式(II)の複合体であって、更に金属を含む複合体である。金属のある態様としては、金属放射性同位元素が挙げられる。金属放射性同位元素のある態様としては、 ^{89}Zr が挙げられる。

[0092] 式(I)の複合体のある実施形態としては、標識部が式(B)で表される蛍光色素である本発明の複合体が挙げられ、当該複合体のある実施形態としては、

下式(III)で表される複合体である：

[0093]

[化16]



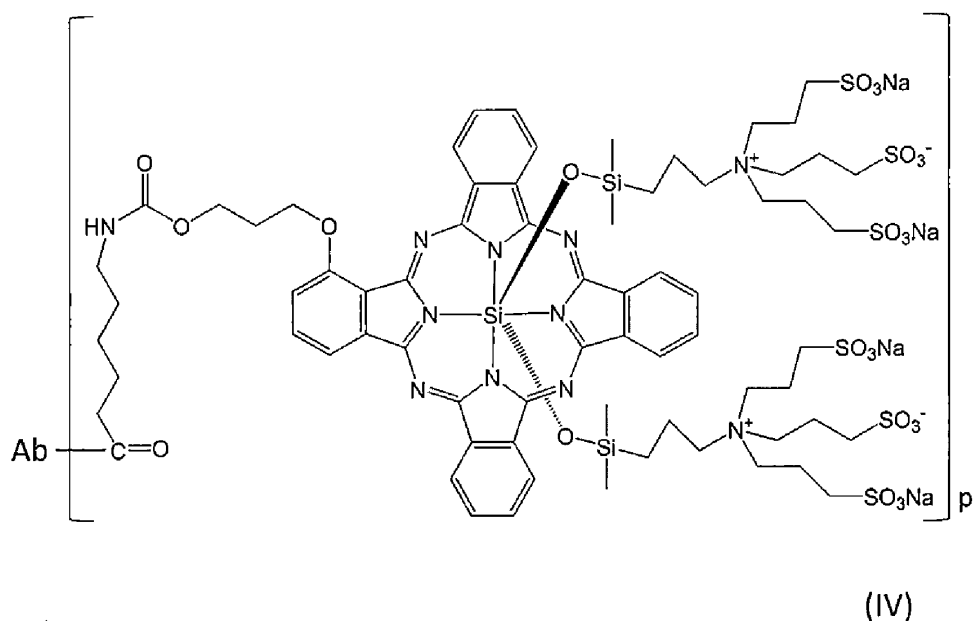
式中、Abは、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを表し、
 pは1～27の自然数であり、pのある態様としては1～23の自然数であり、ある態様としては1～15の自然数であり、ある態様としては1～11の自然数であり、ある態様としては1～9の自然数であり、ある態様としては1～7の自然数であり、ある態様としては1～5の自然数であり、更に、ある態様としては1～4の自然数であり、
 Abはそのアミノ基を介して、標識部末端C(=O)基の炭素原子と結合している。

[0094] 式(I)の複合体のある実施形態としては、標識部が式(C)で表される蛍光色素である本発明の複合体が挙げられ、当該複合体のある実施形態としては

下式(IV)で表される複合体である：

[0095]

[化17]



式中、A bは、抗ヒトMUC 1抗体F a bフラグメントを表し、
 pは1～27の自然数であり、pのある態様としては1～23の自然数であり、ある態様としては1～15の自然数であり、ある態様としては1～11の自然数であり、ある態様としては1～9の自然数であり、ある態様としては1～7の自然数であり、ある態様としては1～5の自然数であり、更に、ある態様としては1～4の自然数であり、
 A bはそのアミノ基を介して、標識部末端C(=O)基の炭素原子と結合している。

[0096] ある実施形態として、本発明の複合体は、検出可能分子で標識された本発明の抗ヒトMUC 1抗体F a bフラグメントである。検出可能分子で標識された本発明の抗ヒトMUC 1抗体F a bフラグメントとは、本発明の抗ヒトMUC 1抗体F a bフラグメントと、検出可能分子とが、直接又は適切にリンカーを介して共有結合的に連結されたものである。本明細書において検出可能分子とは、当該技術分野で公知のイメージング診断技術において検出可能なあらゆる部分を意味する。例えば、イメージング診断技術が蛍光イメー

ジングである場合、検出可能分子は蛍光色素である。イメージング診断技術がPETである場合、検出可能分子はPETによるイメージングが可能な化合物であり、ある態様としては、放射性核種により標識された配位子を含む化合物、又は非金属放射性核種により標識された糖残基が挙げられる。放射性核種により標識された配位子を含む化合物のある態様としては、金属放射性同位元素とキレート錯体を形成した配位子が挙げられる。イメージング診断技術がMRIである場合、検出可能分子はMRI技術により検出可能な化合物であり、ある態様としては、常磁性金属イオンを有する標識された配位子を含む化合物が挙げられる。常磁性金属イオンを有する標識された配位子を含む化合物のある態様としては、常磁性金属イオンとキレート錯体を形成した配位子が挙げられる。

[0097] 検出可能分子で標識された本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントにおいて、検出可能分子の意味で使用する場合、PETによるイメージングが可能な化合物をPETトレーサーと称し、MRI技術により検出可能な化合物をMRI造影剤と称する。

[0098] 検出可能分子で標識された本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントのある実施形態としては、以下のものが挙げられる。

(1) 検出可能分子が蛍光色素、PETトレーサー、又はMRI造影剤である、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント。

(2) 検出可能分子が蛍光色素である、(1)の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント。

(3) 検出可能分子が式(B)で表される蛍光色素である、(2)の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント。

(4) 検出可能分子が式(C)で表される蛍光色素である、(2)の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント。

(5) 検出可能分子がPETトレーサー又はMRI造影剤である、(1)の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメント。

(6) 検出可能分子が式(A)で表される配位子及び常磁性金属イオンを含

むMR I 造影剤であるか、又は同配位子及び金属放射性同位元素を含むPETトレーサーである、抗ヒトMUC 1 抗体Fabフラグメント。

(7) 検出可能分子及びリンカーが式(A')で表される配位子及びリンカー並びに常磁性金属イオンを含むMR I 造影剤であるか、又は同配位子及びリンカー並びに金属放射性同位元素を含むPETトレーサーである、(6)の抗ヒトMUC 1 抗体Fabフラグメント。

[0099] 本発明の抗ヒトMUC 1 抗体Fabフラグメントと、検出可能分子の連結は、前述の方法を利用することができる。

[0100] 本発明の複合体には、複数種の本発明の複合体の混合物である複合体も含まれる。例えば、標識部と翻訳後修飾を受けていない本発明の抗ヒトMUC 1 抗体Fabフラグメントを含む複合体、及び、標識部と前記抗ヒトMUC 1 抗体Fabフラグメントの翻訳後修飾により生じた本発明の抗ヒトMUC 1 抗体Fabフラグメントを含む複合体、の混合物である複合体も、本発明の複合体に含まれる。

[0101] 複数種の本発明の複合体の混合物である本発明の複合体のある実施形態を以下に示す：

(1) 標識部が式(A')で表される配位子及びリンカーであり、抗ヒトMUC 1 抗体Fabフラグメントが、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント及び配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC 1 抗体Fabフラグメントである複合体、並びに、標識部が式(A')で表される配位子及びリンカーであり、抗ヒトMUC 1 抗体Fabフラグメントが、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号4のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒトMUC 1 抗体Fabフラグメントである複合体、の混合物である複合体。

(2) 更に金属を含む、(1)の複合体。

(3) 金属が金属放射性同位元素である、(2)の複合体。

(4) 金属が⁸⁹Zrである、(3)の複合体。

(5) 標識部が式(B)で表される蛍光色素であり、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントが、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント及び配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである複合体、並びに、標識部が式(B)で表される蛍光色素であり、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントが、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号4のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである複合体、の混合物である複合体。

(6) 標識部が式(C)で表される蛍光色素であり、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントが、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメント及び配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである複合体、並びに、標識部が式(C)で表される蛍光色素であり、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントが、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントであって、配列番号4のアミノ酸番号1のグルタミンがピログルタミン酸に修飾された重鎖フラグメント、及び、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントである複合体、の混合物である複合体。

[0102] <本発明のポリヌクレオチド>

本発明のポリヌクレオチドには、本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、及び本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドが含まれる。

[0103] 1つの実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメントをコード

する塩基配列を含むポリヌクレオチド、又は配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメントコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。

[0104] 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号 7 に示される塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号 9 に示される塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。

[0105] 1 つの実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、又は配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。

[0106] 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号 1 に示される塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号 3 に示される塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。

[0107] 1 つの実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号 12 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。

[0108] 配列番号 12 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号 11 に示される塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。

[0109] 1 つの実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドである。

- [0110] 配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドとしては、例えば、配列番号5に示される塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。
- [0111] 本発明のポリヌクレオチドは、本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメント及び軽鎖のアミノ酸配列に基づいてデザインされた塩基配列に基づき、当該技術分野で公知の遺伝子合成方法を利用して合成することが可能である。このような遺伝子合成方法としては、国際公開第90/07861号に記載の抗体遺伝子の合成方法等の当業者に公知の種々の方法が使用され得る。
- [0112] <本発明の発現ベクター>
- 本発明の発現ベクターには、本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、並びに本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターが含まれる。
- [0113] 好ましい本発明の発現ベクターには、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター、並びに配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターが含まれる。
- [0114] 本発明の発現ベクターは、原核細胞及び／又は真核細胞の各種の宿主細胞中で本発明のポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドを産生できるも

のであれば特に制限されない。このような発現ベクターとしては、例えば、プラスミドベクター、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、レトロウイルス）等を挙げられ、好ましくは、pEE6.4やpEE12.4（Lonza社）を使用することができる。

[0115] 本発明の発現ベクターは、本発明のポリヌクレオチドの重鎖フラグメント及び／又は軽鎖をコードする遺伝子に機能可能に連結されたプロモーターを含み得る。宿主細胞中で本発明のFabフラグメントを発現させるためのプロモーターとしては、宿主細胞がエシェリキア属菌の場合、例えば、Trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーター、tacプロモーターなどが挙げられる。酵母中での発現用プロモーターとしては、例えば、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターが挙げられ、バチルス属菌での発現用プロモーターとしては、SLO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなどが挙げられる。また、宿主が哺乳動物細胞等の真核細胞である場合、CMV、RSV、SV40などのウイルス由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、アクチンプロモーター、EF（elongation factor）1 α プロモーター、ヒートショックプロモーターなどが挙げられる。

[0116] 本発明の発現ベクターは、宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、開始コドン、終止コドン、ターミネーター領域及び複製可能単位をさらに含み得る。一方、宿主として酵母、動物細胞又は昆虫細胞を用いる場合、本発明の発現ベクターは、開始コドン、終止コドンを含み得る。また、この場合、エンハンサー配列、本発明の重鎖フラグメント及び／又は軽鎖をコードする遺伝子の5'側及び3'側の非翻訳領域、分泌シグナル配列、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位、又は複製可能単位などを含んでもよい。また、目的に応じて通常用いられる選択マーカー（例えば、テトラサイクリン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子）を含んでい

てもよい。

[0117] <本発明の形質転換された宿主細胞>

本発明の形質転換された宿主細胞には、以下の（a）から（d）からなる群より選択される、本発明の発現ベクターで形質転換された宿主細胞が含まれる：

（a）本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

（b）本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

（c）本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；並びに

（d）本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[0118] 1つの実施形態において、本発明の形質転換された宿主細胞は、以下の（a）～（d）からなる群より選択される、本発明の発現ベクターで形質転換された宿主細胞である：

（a）配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

（b）配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

（c）配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントをコー

ドする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；並びに

(d) 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[0119] 形質転換する宿主細胞としては、使用する発現ベクターに適合し、該発現ベクターで形質転換されて、F a bフラグメントを発現しうるものであれば特に限定されず、本発明の技術分野において通常使用される天然細胞又は人工的に樹立された細胞など種々の細胞（例えば、細菌（エシェリキア属菌、バチルス属菌）、酵母（サッカロマイセス属、ピキア属など）、動物細胞又は昆虫細胞（例えば、S f 9）など）、哺乳動物細胞株（例えば、CHO-K 1 S V細胞、CHO-D G 4 4細胞、2 9 3細胞等の培養細胞）が例示される。形質転換自体は、例えば、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法など、公知の方法により行われ得る。

[0120] <本発明の抗ヒトMUC 1抗体F a bフラグメントを生産する方法>

本発明の抗ヒトMUC 1抗体F a bフラグメントを生産する方法は、本発明の形質転換された宿主細胞を培養し、抗ヒトMUC 1抗体F a bフラグメントを発現させる工程を包含する。

[0121] 1つの実施形態において、本発明の抗ヒトMUC 1抗体F a bフラグメントを生産する方法において培養する本発明の形質転換された宿主細胞は、以下の(a)から(c)からなる群より選択される：

(a) 本発明の抗ヒトMUC 1抗体F a bフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び本発明の記載の抗ヒトMUC 1抗体F a bフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(b) 本発明の記載の抗ヒトMUC 1抗体F a bフラグメントの重鎖フラグ

メントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；並びに

(c) 本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞、及び、本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[0122] ある態様としては、本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを生産する方法において培養する本発明の形質転換された宿主細胞は、以下の(a)から(c)からなる群より選択される：

(a) 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；

(b) 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞；並びに

(c) 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞、及び、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

[0123] 好ましくは、使用される本発明の形質転換された宿主細胞は、本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド及び本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグ

メントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞、あるいは、本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの重鎖フラグメントをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの軽鎖をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞である。

- [0124] 本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを生産する方法において、形質転換された宿主細胞は、栄養培地中で培養され得る。栄養培地は、形質転換された宿主細胞の生育に必要な炭素源、無機窒素源もしくは有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖などが、無機窒素源もしくは有機窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが例示される。また所望により他の栄養素（例えば、無機塩（例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム）、ビタミン類、抗生物質（例えば、テトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等）など）を含んでいてもよい。
- [0125] 形質転換された宿主細胞の培養自体は、公知の方法により行われる。培養条件、例えば、温度、培地のpH及び培養時間は、適宜選択される。例えば、宿主が動物細胞の場合、培地としては、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地（Science；1952；122：501）、DMEM培地（Virology；1959；8：396－97.）、RPMI1640培地（J. Am. Med. Assoc.；1967；199：519－24.）、199培地（Proc. Soc. Exp. Biol. Med.；1950；73：1－8）等を用いることができる。培地のpHは約6～8であるのが好ましく、培養は通常約30～40℃で約15～336時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。宿主が昆虫細胞の場合、例えば、胎児牛血清を含むGrace's培地（PNAS；1985；82：84

04-8.)等が挙げられ、そのpHは約5~8であるのが好ましい。培養は通常約20~40℃で15~100時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。宿主が細菌、放線菌、酵母、糸状菌である場合、例えば、上記栄養源を含有する液体培地が適当である。好ましくは、pHが5~8である培地である。宿主が*E. coli*の場合、好ましい培地としてLB培地、M9培地(Millerら、Exp. Mol. Genet, Cold Spring Harbor Laboratory; 1972:431)等が例示される。かかる場合、培養は、必要により通気、攪拌しながら、通常14~43℃、約3~24時間行うことができる。宿主が*Bacillus*属菌の場合、必要により通気、攪拌をしながら、通常30~40℃、約16~96時間行うことができる。宿主が酵母である場合、培地として、例えば、Burkholder最小培地(PNAS; 1980; 77:4505-8.)が挙げられ、pHは5~8であることが望ましい。培養は通常約20~35℃で約14~144時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

[0126] 本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを生産する方法は、本発明の形質転換された宿主細胞を培養し、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを発現させる工程に加えて、発現させた抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを回収、好ましくは単離、精製する工程を含むことができる。単離、精製方法としては、例えば、塩析、溶媒沈澱法等の溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動など分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーやヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーなどの荷電を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

[0127] <本発明の複合体を生産する方法>

本発明の複合体を生産する方法は、本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフ

ラグメントを、標識部と共有結合させる工程を含む。本発明の複合体を生産する方法はまた、本発明の形質転換された宿主細胞を培養し、抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントを発現させる工程、及び、当該F a bフラグメントと標識部とを共有結合させる工程を含んでいてもよい。本発明の複合体を生産する方法はまた、本発明の形質転換された宿主細胞を培養し、抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントを発現させる工程、発現させた当該F a bフラグメントを回収する工程、及び、当該F a bフラグメントと標識部とを共有結合させる工程を含んでいてもよい。本発明の複合体を生産する方法は、更に、金属を添加する工程を含んでもよい。使用されるリンカー、キレート剤、金属、又は蛍光色素等、及び連結の方法は、＜本発明の複合体＞に記載のものを使用することができる。

[0128] 1つの実施形態において、本発明の複合体を生産する方法は、本発明の形質転換された宿主細胞を培養し、抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントを発現させる工程、及び、当該F a bフラグメントを標識部と共有結合させる工程を含む方法である。ある態様としては、本発明の複合体を生産する方法は、本発明の形質転換された宿主細胞を培養し、抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントを発現させる工程、発現させた当該F a bフラグメントを回収する工程、及び、当該F a bフラグメントを標識部と共有結合させる工程を含む方法である。

[0129] ある態様としては、本発明の複合体を生産する方法は、本発明の形質転換された宿主細胞を培養し、抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントを発現させる工程、及び、当該F a bフラグメントを i) 配位子とリンカーを介して結合させる又は i i) 配位子と直接共有結合させる工程を含む方法である。ある態様としては、本発明の複合体を生産する方法は、本発明の形質転換された宿主細胞を培養し、抗ヒトMUC 1 抗体F a bフラグメントを発現させる工程、発現させた当該F a bフラグメントを回収する工程、及び、当該F a bフラグメントを i) 配位子とリンカーを介して結合させる又は i i) 配位子と直接共有結合させる工程を含む方法である。

- [0130] ある態様としては、本発明の複合体を生産する方法は、本発明の形質転換された宿主細胞を培養し、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを発現させる工程、当該Fabフラグメントをi) 配位子とリンカーを介して結合させる又はii) 配位子と直接共有結合させる工程、及び、当該複合体の配位子を金属で標識させる（即ち、キレート錯体を形成させる）工程を含む方法である。ある態様としては、本発明の複合体を生産する方法は、本発明の形質転換された宿主細胞を培養し、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを発現させる工程、発現させた当該Fabフラグメントを回収する工程、当該Fabフラグメントをi) 配位子とリンカーを介して結合させる又はii) 配位子と直接共有結合させる工程、及び、当該複合体の配位子を金属で標識させる工程を含む方法である。
- [0131] ある態様としては、本発明の複合体を生産する方法は、本発明の形質転換された宿主細胞を培養し、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを発現させる工程、当該Fabフラグメントをi) 配位子とリンカーを介して結合させる又はii) 配位子と直接共有結合させる工程、及び、当該複合体の配位子を金属放射性同位元素で標識させる（即ち、キレート錯体を形成させる）工程を含む方法である。ある態様としては、本発明の複合体を生産する方法は、本発明の形質転換された宿主細胞を培養し、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを発現させる工程、発現させた当該Fabフラグメントを回収する工程、当該Fabフラグメントをi) 配位子とリンカーを介して結合させる又はii) 配位子と直接共有結合させる工程、及び、当該複合体の配位子を金属放射性同位元素で標識させる工程を含む方法である。
- [0132] ある態様としては、本発明の複合体を生産する方法は、本発明の形質転換された宿主細胞を培養し、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを発現させる工程、及び、当該Fabフラグメントをi) 蛍光色素とリンカーを介して結合させる又はii) 蛍光色素と直接共有結合させる工程を含む方法である。ある態様としては、本発明の複合体を生産する方法は、本発明の形質転換された宿主細胞を培養し、抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを発現

させる工程、発現させた当該F a bフラグメントを回収する工程、及び、当該F a bフラグメントをi) 蛍光色素とリンカーを介して結合させる又はi) 蛍光色素と直接共有結合させる工程を含む方法である。

[0133] ある態様としては、本発明の複合体を生産する方法は、本発明の形質転換された宿主細胞を培養し、抗ヒトMUC 1抗体F a bフラグメントを発現させる工程、及び、当該F a bフラグメントを検出可能分子で標識する工程を含む方法である。ある態様としては、本発明の複合体を生産する方法は、本発明の形質転換された宿主細胞を培養し、抗ヒトMUC 1抗体F a bフラグメントを発現させる工程、発現させた当該F a bフラグメントを回収する工程、及び、当該F a bフラグメントを検出可能分子で標識する工程を含む方法である。

[0134] 本発明の複合体を生産する方法は、上記で特定する2以上の工程を一連の工程として含む方法として実施することもできるし、上記で特定する少なくとも一つの工程を含む方法として実施することもできる。例えば、本発明の抗ヒトMUC 1抗体F a bフラグメントを標識部と結合させる工程を含む方法、及び、標識部を結合させた本発明の抗ヒトMUC 1抗体F a bフラグメントに金属で標識する工程を含む方法もまた、本発明の複合体を生産する方法に含まれる。また、本発明の複合体を生産する方法には、工程の順番が異なる方法も含まれる。例えば、キレート剤に金属を標識した後に、当該キレート剤を本発明の抗ヒトMUC 1抗体F a bフラグメントと共有結合させる方法も、本発明の複合体を生産する方法に含まれる。

[0135] <診断用組成物・診断方法>

本発明は、金属又は蛍光色素を含む本発明の複合体（以下、検出可能な本発明の複合体と称する。）を含む、診断用組成物に関する。本発明の診断用組成物は、本発明の複合体を1種類以上含むものであってもよい。すなわち、本発明の診断用組成物は、本発明の複合体を1種類含むものであってもよく、または2種類以上の本発明の複合体の組合せを含むものであってもよい。検出可能な本発明の複合体は、常法に従って製剤化され、早期診断薬、病

期診断薬又は術中診断薬（特に癌の診断薬）として利用することができる。術中診断薬とは、外科手術や内視鏡手術等の手術中に、病変部を特定し、その性質を検査することが可能な診断薬を意味する。本発明の診断用組成物を術中診断薬として使用する場合、当該診断用組成物は、例えば手術の2～32時間前、ある態様としては6～24時間前、また別の態様としては2時間前、に患者に投与される。

[0136] 早期診断薬とは、病状が観察されない、又は病期の早い段階で診断を行うことを目的とする診断薬を意味する。例えば、癌においては、病状が観察されないか、ステージ0又はステージ1の段階で用いる診断薬を意味する。

[0137] 病期診断薬とは、病状がどの程度進行しているかを検査することが可能な診断薬を意味する。例えば、癌については、そのステージを検査することが可能な診断薬を意味する。

[0138] 本発明の診断用組成物により診断できることが期待される癌は、ヒトMUC1を発現する癌である。ある態様としては、乳癌、肺癌、大腸癌、膀胱癌、皮膚癌、甲状腺癌、胃癌、膵臓癌、腎臓癌、卵巣癌又は子宮頸癌が挙げられる。好ましくは、当該癌は乳癌又は膀胱癌である。

[0139] 本発明の診断用組成物の製剤化にあたっての本発明の複合体の添加量は、患者の症状の程度や年齢、使用する製剤の剤型、あるいはFabフラグメントの結合力価等により異なるが、例えば、患者の単位体重あたりFabフラグメントの質量ベースで0.001mg/kgないし100mg/kg程度を用いればよい。

[0140] 本発明の診断用組成物の剤型の例としては、注射剤、点滴用剤等の非経口剤を挙げることができ、静脈内注射、標的組織局所への筋肉内注射、皮下注射、膀胱内投与等により投与することができる。また、製剤化にあたっては、薬学的に許容される範囲で、これら剤型に応じた担体や添加剤を使用することができる。薬学的に許容される担体や添加剤の種類は特に限定されず、当業者に周知の担体や添加剤を用いることができる。

[0141] 本発明はまた、癌の早期診断用組成物、病期診断用組成物または術中診断

用組成物の製造のための、検出可能な本発明の複合体の使用に関する。本発明は、癌の早期診断、病期診断又は術中診断において使用するための、検出可能な本発明の複合体にも関する。

[0142] そして、本発明は、検出可能な本発明の複合体を、手術前又は手術中に対象に投与することを含む癌の診断方法にも関する。ここにおいて、「対象」とは、その診断を受けることを必要とするヒト又はその他の哺乳動物であり、ある態様としては、その診断を受けることを必要とするヒトである。本発明の診断方法における検出可能な本発明の複合体の有効量は上記製剤化にあたっての本発明の複合体の有効量と同様の量であってもよい。本発明の診断方法において、検出可能な本発明の複合体は、標的組織局所への筋肉内注射、皮下注射等により投与することが好ましい。本発明の診断方法において、本発明の複合体を手術前に投与する場合、当該複合体は、例えば手術の2～48時間前、ある態様としては6～24時間前、また別の態様としては2時間前、に患者に投与される。

[0143] 別の実施形態において、本発明は、本発明の複合体の製造のための、本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの使用にも関する。ある態様としては、本発明は、本発明の複合体を含む診断用組成物の製造のための、本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの使用にも関する。

[0144] また、金属放射性同位元素を含む本発明の診断用組成物が提供される際の態様としては、使用の直前に金属放射性同位元素で標識されてもよく、金属放射性同位元素を含む診断用組成物として提供されてもよい。

[0145] <治療用組成物・治療方法>

本発明には、1種類以上の本発明の複合体及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物が含まれる。すなわち、本発明の治療用組成物は、本発明の複合体を1種類含むものであってもよく、または2種類以上の本発明の複合体の組合せを含むものであってもよい。本発明の複合体は、当該分野において通常用いられている賦形剤、即ち、薬剤用賦形剤や薬剤用担体等を用いて、通常使用される方法によって医薬組成物の調製に用いることができる。こ

れら医薬組成物の剤型の例としては、例えば、注射剤、点滴用剤等の非経口剤が挙げられ、静脈内投与、皮下投与、膀胱内投与等により投与することができる。製剤化にあたっては、薬学的に許容される範囲で、これら剤型に応じた賦形剤、担体、添加剤等を使用することができる。

[0146] 上記製剤化に当たっての本発明の複合体の添加量は、患者の症状の程度や年齢、使用する製剤の剤型、あるいはF a bフラグメントの結合力価等により異なるが、例えば、患者の単位体重あたりF a bフラグメントの質量ベースで0.001mg/kgないし100mg/kg程度を用いることができる。

[0147] 本発明の複合体を含む医薬組成物は、癌の治療のために用いることができる。本発明の複合体を含む医薬組成物により治療できることが期待される癌は、ヒトMUC1を発現する癌であり、例えば、乳癌、肺癌、大腸癌、膀胱癌、皮膚癌、甲状腺癌、胃癌、膵臓癌、腎臓癌、卵巣癌又は子宮頸癌が挙げられる。

[0148] ある態様としては、本発明の複合体を含む医薬組成物は、蛍光色素を含む複合体を含む医薬組成物であり、光免疫療法に適用して癌の治療に用いることができる。光免疫療法は、蛍光色素を含む複合体を癌組織に特異的に集積させた後に、当該複合体に含まれる蛍光色素を励起する波長の光を照射し、当該蛍光色素による光毒性効果により、癌特異的に細胞死を誘導する方法である。蛍光色素を含む本発明の複合体を光免疫療法に用いる場合、照射する光の波長は近赤外波長（650～1000nm）であってよい。

[0149] 本発明には、本発明の複合体を含む、乳癌又は膀胱癌を治療するための医薬組成物が含まれる。また、本発明には、本発明の複体の治療有効量を投与する工程を包含する、乳癌又は膀胱癌を治療する方法が含まれ、当該工程に加えて、近赤外波長（650～1000 nm、例えば660～740 nm、例えば680 nm）の光を照射する工程を含むことができる。ある態様としては、光を照射する線量は少なくとも $1\text{ J}/\text{cm}^2$ であり、ある態様としては少なくとも $10\text{ J}/\text{cm}^2$ であり、ある態様としては少なくとも $100\text{ J}/\text{cm}^2$

cm^2 であり、ある態様としては $1 \sim 500 \text{ J} / \text{cm}^2$ であり、ある態様としては $50 \sim 200 \text{ J} / \text{cm}^2$ である。ある実施形態においては、本発明の複合体を投与後に、複数回にわたって照射を実施することもできる。また、本発明には、本発明の複合体の治療有効量を投与する工程を包含する、乳癌又は膀胱癌の癌細胞の細胞死を誘導する方法が含まれる。

[0150] 癌を治療するための医薬組成物は、癌の診断にも用いることができる。例えば、乳癌又は膀胱癌を治療するための医薬組成物を、当該癌の診断にも用いることもできる。

[0151] また、本発明には、乳癌又は膀胱癌の治療に使用するための、本発明の複合体が含まれる。さらに、本発明には、乳癌又は膀胱癌を治療するための医薬組成物の製造のための、本発明の複合体の使用が含まれる。

[0152] 別の実施形態において、本発明は、本発明の複合体を含む医薬組成物の製造のための、本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの使用にも関する。

[0153] 本発明について全般的に記載したが、さらに理解を得るために参照する特定の実施例をここに提供する。しかし、これらは例示を目的とするものであって、本発明を限定するものではない。

実施例

[0154] (実施例1：抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントの作製)

P10-1 Fab及びP10-2 Fabと称する2種類の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントを作製した。

[0155] P10-1 Fab及びP10-2 Fabの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、具体的には、マウス由来の抗ヒト癌特異的MUC1抗体である1B2抗体を文献(Front Biosci., 2008 Jan 1; 13:1619-33)に記載の方法を参考にしてヒト化後、文献(Proteins, 2014 Aug; 82(8):1624-35)に準じて構築したヒト化抗体の分子モデルを用いて、親和性の向上及び標識部を結合させても親和性が減弱しないことが期待される配列を設計した

。

[0156] P10-1 Fab及びP10-2 Fabの各重鎖可変領域遺伝子の5'側にシグナル配列(MEWSWVFLFFLSVTTGVHS(配列番号13))をコードする遺伝子を、そして3'側にヒトIgγ1の定常領域遺伝子(配列番号1及び3の塩基番号355から669までの塩基配列からなる)をそれぞれ繋げてできる重鎖フラグメント遺伝子が挿入されたGSベクターpEE6.4(Lonza社)を作製した。ここで、Fabフラグメントとして発現させるために、重鎖定常領域遺伝子において、KabatraによるEUインデックスに基づく221番目のAsp(後述の配列番号2及び4のアミノ酸配列中の222番目のAspに対応)のコドンの後に停止コドン挿入した。また、P10-1 Fab及びP10-2 Fab共通の軽鎖可変領域遺伝子の5'側にシグナル配列(MSVPTQVLGLLLWLTDARC(配列番号14))をコードする遺伝子を、そして3'側にヒトκ鎖の定常領域遺伝子(配列番号5の塩基番号340から660までの塩基配列からなる)をそれぞれ繋げてできる軽鎖遺伝子が挿入されたGSベクターpEE12.4(Lonza社)を作製した。

[0157] 一過性発現の方法でFabフラグメントの発現を行った。Expi293 Expression Medium(Thermo Fisher Scientific社)で約250万個/mLに培養されたExpi293 F細胞(Thermo Fisher Scientific社)に対し、前述の重鎖フラグメント及び軽鎖のGSベクターをExpiFectamine 293 Transfection Kit(Thermo Fisher Scientific社)を用いてトランスフェクトし、8日間培養した。発現させた後、培養上清をKappaSelect(GE Healthcare社)を用いて精製し、各Fabフラグメントを得た。

[0158] P10-1 Fabの重鎖フラグメントの塩基配列を配列番号1に、それによりコードされるアミノ酸配列を配列番号2にそれぞれ示す。P10-1 Fabの重鎖可変領域の塩基配列を配列番号7に、それによりコードされ

るアミノ酸配列を配列番号8にそれぞれ示す。

- [0159] P10-2 Fabの重鎖フラグメントの塩基配列を配列番号3に、それによりコードされるアミノ酸配列を配列番号4にそれぞれ示す。P10-2 Fabの重鎖可変領域の塩基配列を配列番号9に、それによりコードされるアミノ酸配列を配列番号10にそれぞれ示す。

- [0160] P10-1 Fab及びP10-2 Fabの軽鎖は共通で、その塩基配列は配列番号5に、それによりコードされるアミノ酸配列は配列番号6にそれぞれ示す。P10-1 Fab及びP10-2 Fabの軽鎖可変領域の塩基配列を配列番号11に、それによりコードされるアミノ酸配列を配列番号12にそれぞれ示す。

- [0161] (実施例2：Fabフラグメントのアミノ酸修飾分析)

精製したP10-2 Fabのアミノ酸修飾を分析した結果、精製抗体の大部分において、重鎖N末端のグルタミンがピログルタミン酸に修飾されていることが示唆された。

- [0162] (実施例3：Fabフラグメントの結合活性評価)

前述の方法で発現させたP10-1 Fab及びP10-2 Fabについて、ヒト癌特異的MUC1に対する結合活性をCell ELISA法によりキメラ1B2抗体Fabフラグメント（以下、1B2 Fabと表記することがある。1B2抗体（特許文献1）のVHドメイン及びVLドメイン（配列情報は特許文献1から引用）に、ヒトIgG1のCH1ドメイン、κ鎖のCLドメインをそれぞれ連結して作製した。CH1ドメイン及びCLドメインを連結する都合上、VHドメインのKabataらによるEUインデックスに基づく113番目のアラニン残基がセリン残基に、VLドメインのKabataらによるEUインデックスに基づく109番目のアラニン残基がスレオニン残基に置換されている。）と比較した。すなわち、ヒト癌特異的MUC1を発現する乳癌細胞株T-47D細胞（ATCCより購入可能；HTB-133）を1ウェルあたり0.75×10⁴細胞、コラーゲンIでコートした96ウェルELISAプレートに播種し、一晚培養後、細胞をホルマリ

ンで固定化し、それに対して上記P10-1 Fab、P10-2 Fab又は1B2 Fabを反応させた後、二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ(Horseradish Peroxidase:HRP)標識ヤギ抗ヒトIgκ抗体(Southern Biotechnology Associates社)を反応させ、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent(GE Healthcare社)を加えて発光させ、その発光度を調べた。その結果、図1に示したようにP10-1 Fab及びP10-2 Fabは1B2 Fabの約10倍以上のヒト癌特異的MUC1に対する結合活性を持つことが確認された。

[0163] (実施例4: Fabフラグメントの蛍光標識化)

次いで、本発明者らは、前述のP10-1 Fab、P10-2 Fab及び1B2 Fabに対して蛍光色素の導入を行った。

[0164] 具体的には、リン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)にて約1mg/mLに調整したFabフラグメント溶液に、1/10量の1Mリン酸水素二カリウム溶液(pH9)を添加してpH8.5に整えた。これに終濃度310.8μg/mLとなるようにIRDye800CW NHS Ester(LICOR Biosciences社)を添加し、室温及び遮光で2時間攪拌した。IRDye800CW NHS EsterはN-ヒドロキシスクシンイミド基を有しているので、FabフラグメントのLysと速やかに反応する。これをアミコンウルトラ3K-0.5mL遠心式フィルター(Merck Millipore社)で回収し、蛍光標識化したFabフラグメントを精製した。この蛍光色素を導入したP10-1 Fab、P10-2 Fab及び1B2 Fabを、P10-1 Fab Dye、P10-2 Fab Dye及び1B2 Fab Dyeと称する。

[0165] (実施例5: 蛍光標識化Fabフラグメントの結合活性評価)

前述の方法で標識したP10-1 Fab Dye及びP10-2 Fab Dyeについて、ヒト癌特異的MUC1に対する結合活性をCell

ELISA法により1B2 Fab Dyeと比較した。すなわち、ヒト癌特異的MUC1を発現する乳癌細胞株T-47D細胞を1ウェルあたり 0.75×10^4 細胞、コラーゲンIでコートした96ウェルELISAプレートに播種し、一晚培養後、細胞をホルマリンで固定化し、それに対して上記P10-1 Fab Dye、P10-2 Fab Dye又は1B2 Fab Dyeを反応させた後、二次抗体としてHRP標識ヤギ抗ヒトIg κ 抗体 (Southern Biotechnology Associates社) を反応させ、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare社) を加えて発光させ、その発光度を調べた。その結果、図2に示したように1B2 Fab Dyeは標識によって結合活性が減弱するのに対して、P10-1 Fab Dye及びP10-2 Fab Dyeは標識によって結合活性が減弱しないことが確認された。

[0166] (実施例6：Fabフラグメントのキレート剤標識化)

次いで、本発明者らは、前述のP10-2 Fabに対してキレート剤の導入を行った。

[0167] 具体的には、リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) にて12.5 mg/mLに調整したFabフラグメント溶液に、10 mMとなるように100 mM炭酸ナトリウム溶液を添加してpH 9.0に整えた。これに終濃度1 mMとなるようにp-SCN-Bn-デフェロキサミン (Macrocyclics社) を添加し、37℃で2時間反応した。p-SCN-Bn-デフェロキサミンはイソチオシアネート基を有しているので、FabフラグメントのLysと速やかに反応する。これをアミコンウルトラ10K-0.5 mL遠心式フィルターで回収し、キレート剤標識化したFabフラグメントを精製した。このキレート剤標識化したP10-2 Fabを、P10-2 Fab DFOと称する。

[0168] (実施例7：キレート剤標識化Fabフラグメントの結合活性評価)

前述の方法で標識したP10-2 Fab DFOについて、ヒト癌特異

的MUC1に対する結合活性をCell ELISA法によりP10-2 Fabと比較した。すなわち、ヒト癌特異的MUC1を発現するT-47D細胞を 0.75×10^4 細胞、コラーゲンIでコートした96ウェルELISAプレートに播種し、一晚培養後、細胞をホルマリンで固定化し、それに対して上記P10-2 Fab DFO又はP10-2 Fabを反応させた後、二次抗体としてHRP標識ヤギ抗ヒトIg κ 抗体（Southern Biotechnology Associates社）を反応させ、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent（GE Healthcare社）を加えて発光させ、その発光度を調べた。その結果、図3に示したようにP10-2 Fab DFOとP10-2 Fabの結合活性は同等であり、P10-2 Fabはキレート剤標識によって結合活性が減弱しないことが確認された。

[0169]（実施例8：ヒト膀胱癌組織サンプルにおけるP10-2の反応性）

ヒト膀胱癌におけるP10-2 Fabの反応性を検討するために、ヒト膀胱癌組織アレイ（US Biomax社 BC12011b）を用いた免疫染色法で検討した。P10-2 Fabを一次抗体として用いると、二次抗体として用いる抗ヒト抗体がヒト組織に交差してしまうため、一次抗体にはマウスキメラP10-2 IgG（P10-2 FabのVHドメイン及びVLドメインに、マウスIgG2aのCH1～3ドメイン及びマウス κ 鎖のCLドメインをそれぞれ融合した抗体）を作製して用いた。ヒト膀胱癌組織アレイサンプルを3%の過酸化水素溶液で5分間反応後、pH7.4のリン酸緩衝生理食塩水で洗浄した。その後、マウスキメラP10-2 IgG（ $0.25 \mu\text{g/mL}$ ）を反応させた後、二次抗体としてOne-Step Polymer-HRP抗体（Biogenex社）を反応させ、Super Sensitive DAB（Biogenex社）を加えて発色させた。癌組織に対する染色の陽性反応の判定は±：ごく軽度の陽性、+：陽性、++：中等度の陽性、+++：高度の陽性とし、癌組織が明らかでない1例を除外した。その結果、±は11例、+は24例、++は17例、+++

＋は5例であり、検討した59例中57例で陽性反応がみとめられた（陽性率97％）。

[0170] （実施例9：キレート剤標識化Fabフラグメントの ^{89}Zr 標識化）

^{89}Zr は1Mシュウ酸水溶液に溶解した $^{89}\text{Zr-Oxalate}$ （岡山大学）として製造したものを使用した。20 μL の $^{89}\text{Zr-Oxalate}$ （21.4MBq）を10 μL の2M炭酸ナトリウム水溶液で中和した後、250mM酢酸ナトリウム水溶液に溶解した5mg/mLゲンチジン酸溶液を70 μL 加えた。さらに、0.1%ポリソルベート80及び20%グリセロールを含む500mM HEPES（4-（2-hydroxyethyl）-1-piperazineethanesulfonic acid）水溶液を200 μL 添加した。この ^{89}Zr を含む溶液に9.5mg/mLのP10-2 Fab DFOを100 μL 添加し、室温で30分間反応させた。得られた反応混合物をアミコンウルトラ10K-0.5mL遠心式フィルター（Merck Millipore社）を用いて精製し、さらにメンブランフィルター（Millex-GV 0.22 μm 13mm；Merck Millipore社）でろ過することで目的のP10-2 Fab DFOの ^{89}Zr 標識体（16.1MBq）を得た。この ^{89}Zr 標識したP10-2 Fab DFOをP10-2 Fab DFO ^{89}Zr と称する。得られたP10-2 Fab DFO ^{89}Zr 溶液を高速液体クロマトグラフィー（20ADシリーズ；島津製作所）を用いて分析し、P10-2 Fab DFOの保持時間（UV：10.192分）とP10-2 Fab DFO ^{89}Zr の保持時間（UV：10.178分、RI：10.515分）を比較し、それぞれの保持時間が同等であったことからP10-2 Fab DFOが ^{89}Zr によって標識されていることを確認した。HPLC分析は以下の条件で実施した。カラム：BioSep SEC s3000 300 $\times$ 7.8mm（Phenomenex社）、カラム温度：室温、UV検出器波長：280nm、移動相：リン酸緩衝液（Gibco社、10010-023）、流速：1mL/min

[0171] (実施例10: FabフラグメントへのIRDye700DX付加)

IRDye700DXのP10-2 Fabへの付加には、IRDye700DX NHS Ester (LI-COR Biosciences社)を使用した。

[0172] 具体的には、リン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)にて1mg/mLに調整したP10-2 Fab溶液に、1/10量の1Mリン酸水素二カリウム溶液(pH9)を添加した。これに終濃度154μg/mLとなるようにIRDye700DX NHS Esterを添加し、室温で2時間攪拌した。反応後、アミコンウルトラ10K-15mL遠心式フィルター(Merck Millipore社)で回収し、IRDye700DXを付加したP10-2 Fabを精製した。このようにIRDye700DXを付加したP10-2 FabをP10-2 Fab IR700と称する。

[0173] (実施例11: Fabフラグメントの乳癌細胞株及び膀胱癌細胞株に対する結合活性評価)

ヒト乳癌及び膀胱癌におけるP10-2 Fabの結合活性を検討した。

[0174] 具体的には、ヒト癌特異的MUC1を発現するヒト乳癌細胞株MDA-MB-468細胞(ATCCより購入可能; HTB-132、以下MM-468細胞)及びヒト膀胱癌細胞株647-V細胞(DSMZより購入可能; ACC 414)を96ウェルプレートに1ウェルあたり 1×10^4 細胞播種し、一晚培養後、上記P10-2 Fabを0.0000003-0.001mg/mLの濃度で反応させた後、二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ(Horseradish Peroxidase: HRP)標識ヤギ抗ヒトIgG抗体(Medical & Biological Laboratories社)を反応させ、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent(GE Healthcare社)を加えて発光させ、その発光度を調べた。その結果、図4に示したようにP10-2 Fabはヒト乳癌細胞株MM-468細胞及びヒト膀胱癌細胞株647-V細胞に結合活性を持つことが示された。

[0175] (実施例12:皮下担癌モデルにおける蛍光標識化Fabフラグメントの造影評価)

免疫不全マウス(SCIDマウス;日本チャールス・リバー社)の右背部の皮下にヒト癌特異的MUC1陽性細胞としてヒト乳癌細胞株MM-468細胞を 3×10^6 細胞移植した。移植後約1か月に腫瘍形成されたマウスを選別し、リン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)に溶解したP10-2 Fab Dy eを0.1、0.3、1又は3mg/kgの用量で静脈投与した(0.1mg/kg投与群はN=2で、0.3、1及び3mg/kg投与群はN=3で実施した)。P10-2 Fab Dy e投与6時間後、及び24時間後に通常のカメラ及び近赤外蛍光カメラ(Fluobeam(800nmフィルター);Fluoptics社)で撮像し、赤外蛍光カメラで撮像した図の腫瘍部分(Tumor)及び腫瘍周囲の正常部分(Background)の蛍光輝度を測定した。その結果、図5Aに示すようにP10-2 Fab Dy eは、投与6時間後において、ヒト癌特異的MUC1陽性MM-468腫瘍部位に集積し蛍光画像で明瞭に視認することが示された。また、図5Bに示すように0.1~3mg/kgの範囲においてP10-2 Fab Dy e投与用量依存的に腫瘍部位蛍光輝度/正常部位蛍光輝度比が上昇することが示された。さらにその効果は投与24時間後においても持続していることが明らかになった。これらの結果から、P10-2 Fab Dy eは投与6時間後から24時間後において、ヒトMUC1陽性の癌細胞を検出できることが明らかになった。

[0176] (実施例13:IRDye700DX付加Fabフラグメントによる腫瘍の検出)

免疫不全マウス(ヌードマウス;日本チャールス・リバー社)の右背部の皮下にMM-468細胞を 5×10^6 細胞移植した。本試験はN=2で実施した。移植40日後、P10-2 Fab IR700(3mg/kg)又はVehicle(リン酸緩衝生理食塩水)を静脈投与した。P10-2 Fab IR700投与2時間後に動物を安楽死させ、腫瘍を摘出し、IVI

S SPECTRUM (Perkin Elmer 社) で 675 nm の波長で励起して 740 nm の波長で検出し、腫瘍部分の発光量を測定した。その結果、図 6 に示すように P10-2 Fab IR700 は、投与 2 時間後において MM-468 細胞に集積することが示された。

[0177] (実施例 14: IRDye 700DX 付加 Fab フラグメントの細胞障害性評価)

P10-2 Fab IR700 の癌治療への利用を検討するために、光免疫療法による細胞障害性を評価した。

[0178] 具体的には、ヒト乳癌細胞株 MM-468 細胞、ヒト膀胱癌細胞株 647-V 細胞又は比較例として CHO-K1 細胞 (ATCC より購入可能; CCL-61) を 384 ウェル白色プレートに 1 ウェルあたり 5×10^3 細胞播種し、一晚培養後、P10-2 Fab IR700 を 0、0.01、0.1、又は $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ で反応させた後、波長 680 nm の光を $0 \sim 30 \text{ J}/\text{cm}^2$ になるように照射した。光照射後、一晚培養し、Cell Titer-Glo (Promega 社) 加えて発光させ、発光量を測定することで細胞の生細胞数を測定した。なお、本試験は、条件ごとにそれぞれ 3 ウェルずつ実施した。その結果、図 7 に示したように、P10-2 Fab IR700 は、光照射により、ヒト癌特異的 MUC1 の発現特異的に細胞障害性を示すことが明らかとなった。

[0179] (実施例 15: IRDye 700DX 付加 Fab フラグメントの抗腫瘍活性評価)

免疫不全マウス (ヌードマウス; 日本チャールス・リバー社) の右背部の皮下に MM-468 細胞を 5×10^6 細胞、移植した。本試験は $N=4$ で実施した。腫瘍体積が 300 mm^3 になった後、P10-2 Fab IR700 (0.3、1、又は $3 \text{ mg}/\text{kg}$) を 1、5、8、12 及び 15 日目に静脈投与した。Vehicle 群にはリン酸緩衝生理食塩水を同様に投与した。薬物投与の翌日に波長 680 nm の光を 0 又は $200 \text{ J}/\text{cm}^2$ になるように照射し、経日的に腫瘍体積を測定した。その結果、図 8 に示すように、P1

O-2 Fab IR700は、投与量及び光照射依存的に抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

産業上の利用可能性

[0180] 本発明の抗ヒトMUC1抗体Fabフラグメントは、乳癌、肺癌、大腸癌、膀胱癌、皮膚癌、甲状腺癌、胃癌、膵臓癌、腎臓癌、卵巣癌又は子宮頸癌等の癌の診断及び／又は治療に有用であることが期待される。

配列表フリーテキスト

[0181] 配列番号1：P10-1 Fab重鎖フラグメントをコードするDNAの塩基配列

配列番号2：P10-1 Fab重鎖フラグメントのアミノ酸配列

配列番号3：P10-2 Fab重鎖フラグメントをコードするDNAの塩基配列

配列番号4：P10-2 Fab重鎖フラグメントのアミノ酸配列

配列番号5：抗体軽鎖をコードするDNAの塩基配列

配列番号6：抗体軽鎖のアミノ酸配列

配列番号7：P10-1 Fab重鎖可変領域をコードするDNAの塩基配列

配列番号8：P10-1 Fab重鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号9：P10-2 Fab重鎖可変領域をコードするDNAの塩基配列

配列番号10：P10-2 Fab重鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号11：抗体軽鎖可変領域をコードするDNAの塩基配列

配列番号12：抗体軽鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号13：重鎖シグナル配列

配列番号14：軽鎖シグナル配列

配列番号15：MUC1の細胞外ドメインのタンデムリピート配列