

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7017581号
(P7017581)

(45)発行日 令和4年3月3日(2022.3.3)

(24)登録日 令和4年1月31日(2022.1.31)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

Z N A

C 0 7 K 16/30 (2006.01)

C 0 7 K 16/30

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63

Z

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 14 (全29頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-555140(P2019-555140)

(86)(22)出願日 平成29年8月16日(2017.8.16)

(65)公表番号 特表2020-520230(P2020-520230
A)

(43)公表日 令和2年7月9日(2020.7.9)

(86)国際出願番号 PCT/KR2017/008893

(87)国際公開番号 WO2019/022281

(87)国際公開日 平成31年1月31日(2019.1.31)

審査請求日 令和1年10月17日(2019.10.17)

(31)優先権主張番号 10-2017-0096370

(32)優先日 平成29年7月28日(2017.7.28)

(33)優先権主張国・地域又は機関
韓国(KR)

(73)特許権者 509099202

トンア ユニバーシティ リサーチ ファ
ウンデーション フォー インダストリー
- アカデミー コーポレーションDong - A University R
esearch Foundation
For Industry - Acade
my Cooperation大韓民国, 604 - 714 プサン, サ
ハ - グ, ナクドン - デロ 550ボン -
ギル 37

(73)特許権者 516027775

プレステージ バイオファーマ プライベ
ート リミテッドシンガポール国 118222 シンガポ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 P A U F タンパク質に特異的に結合する抗体及びその用途

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1の重鎖CDR1；配列番号2または39の重鎖CDR2；及び配列番号3、4
または30の重鎖CDR3を含む重鎖可変領域及び配列番号5の軽鎖CDR1；配列番号6の軽鎖CDR2；及び配列番号7または31の軽
鎖CDR3を含む軽鎖可変領域を含む、P A U F (Pancreatic adenocarcinoma upreg
ulated factor) タンパク質に結合する抗体。

【請求項2】

前記抗体の重鎖可変領域は、配列番号8、19、または32の重鎖FR1；配列番号9ま
たは20の重鎖FR2；配列番号10、21、または33の重鎖FR3；及び配列番号1
1、12、22、23、または34の重鎖FR4を含み、前記抗体の軽鎖可変領域は、配列番号13、24、または35の軽鎖FR1；配列番号1
4または25の軽鎖FR2；配列番号15または26の軽鎖FR3；及び配列番号16、
27または36の軽鎖FR4を含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】

前記重鎖可変領域は、配列番号17、28、または37のアミノ酸配列からなり；

前記軽鎖可変領域は、配列番号18、29、または38のアミノ酸配列からなるものであ
る、請求項1に記載の抗体。

【請求項4】

請求項1～3のいずれか一項に記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 5】

請求項 4 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の発現ベクターが導入された形質転換体。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体を含む、癌の予防または治療用医薬組成物。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体をヒト以外の個体に投与する段階を含む、癌の予防または治療方法。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体をヒト以外の個体に投与する段階を含む、癌細胞の増殖、移動、または浸潤を抑制する方法。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体に薬物が結合された、抗体 - 薬物結合体。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体を含む、癌診断用組成物。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の組成物を含む、癌診断用キット。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体を用いて、癌が疑われる個体の分離された生物学的試料から P A U F (Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor) タンパク質を抗原抗体反応を通じて検出する段階を含む、癌の診断のための情報を提供する方法。

【請求項 14】

(a) 個体から分離された癌細胞に癌の予防または治療候補物質を処理する段階 ;
 (b) 前記候補物質が処理された癌細胞において、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体を用いて、P A U F (Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor) タンパク質のレベルを測定する段階 ; 及び
 (c) 前記段階 (b) の P A U F タンパク質のレベルが候補物質を処理していない癌細胞のものより減少する場合、前記 (a) 段階で処理した候補物質を癌の予防または治療物質と判断する段階を含む、癌の予防または治療物質のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、P A U F (Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor) タンパク質に特異的に結合する抗体及びその用途に関する。

【背景技術】

【0002】

現在、臨床的に使用している抗癌剤は、化学療法剤と生物療法剤に分類することができる。過去活発に開発された化学療法剤は、癌細胞に毒性を示す薬剤であり、癌細胞だけでなく、正常な細胞にも毒性を示し、また、耐性を示すという問題があり、開発及び使用に限界を示している。そこで、最近では、人体の免疫機能を回復させたり、増加させて癌細胞の活動を弱体化させる生物療法剤がその代案として活発に開発されている。現在使用されたり、開発されている生物療法剤としては、サイトカイン類、モノクローナル抗体 (monoclonal antibody) などの組換え抗体、核酸分子治療剤及び新生血管形成阻害剤などがある。

【0003】

上述した生物療法剤の中でも、治療用モノクローナル抗体は、標的に対する反応特異性が高く、副作用が低いことが特徴である。抗体は、種々のメカニズムにより治療効果を示すが、該当抗原と特異的に結合してシグナル伝達を阻害したり、架橋結合 (cross-linking) による細胞死滅を誘導することができ、また、生体内の免疫システムを活性化してその

10

20

30

40

50

効果を示すこともできる。したがって、抗癌剤としてのモノクローナル抗体は、癌細胞を特異的に追跡し、その活性を抑制することはもちろん、免疫反応を起こして癌細胞を効果的に除去することができるため、癌治療の主流として位置づけられてきている。これに関連し、ラムシルマブ (ramucirumab)、リツキシマブ (rituximab)、トラスツズマブ (trastuzumab) などのモノクローナル抗体が開発され、胃癌、乳癌、肝臓癌などの治療に使用されている。

【0004】

一方、PAUF (Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor) タンパク質は、膵臓癌、卵巣癌、大腸癌、子宮頸癌などの癌細胞で過発現されて腫瘍の発達及び転移に関与するタンパク質であり、新たなパターンのリン酸化を通じて - カテニンを上方調節し、安定させて膵臓癌細胞の急速増殖に寄与すると言われている (Experimental & Molecular Medicine, 2011, 43, 82-90 (非特許文献1))。また、PAUFタンパク質を標的とする低分子干渉RNA (small-interfering RNA) は、膵臓癌細胞の移動、侵入及び腫瘍形成能力を減少させることが報告されることにより、癌の診断、治療などの標的としてPAUFタンパク質に対する関心が高まっており (Cancer Sci. 2009 May, 100(5):828-36.; Biochem Biophys Res Commun. 2014 Nov, 454(1):144-50. (非特許文献2))、これに関連し、抗PAUFタンパク質ヒト抗体を含む膵臓癌診断及び治療用組成物が開発されている (韓国登録特許公報第10-1098186号 (特許文献1))。しかし、PAUFタンパク質に対する結合力及び親和力を向上させるとともに、多様な種類の癌診断及び治療に優れた効果を有する抗体の開発が依然として必要であるのが現状である。

10

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【文献】韓国登録特許公報第10-1098186号

【非特許文献】

【0006】

【文献】Experimental & Molecular Medicine, 2011, 43, 82-90
Cancer Sci. 2009 May, 100(5):828-36.; Biochem Biophys Res Commun. 2014 Nov, 454(1):144-50.

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明者らは、PAUFタンパク質に特異的に結合し、多様な癌に対して優れた治療及び診断の効果を示し得る抗体を開発すべく鋭意努力研究した結果、抗PAUFマウス抗体を基盤としたキメラ及びヒト化抗体を開発し、これらは、既存の抗PAUFヒト抗体に比べてPAUFタンパク質にさらに高い親和度及び特異度を有し、膵臓癌または卵巣癌などに対してより優れた抗癌効果を示すことを確認し、本発明を完成した。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の一つの目的は、PAUF (Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor) タンパク質に結合する抗体を提供することにある。

40

【0009】

本発明の他の一つの目的は、前記抗体をコードするポリヌクレオチドを提供することにある。

【0010】

本発明のもう一つの目的は、前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供することにある。

【0011】

本発明のもう一つの目的は、前記発現ベクターが導入された形質転換体を提供することに

50

ある。

【 0 0 1 2 】

本発明のもう一つの目的は、前記抗体を含む、癌の予防または治療用医薬組成物を提供することにある。

【 0 0 1 3 】

本発明のもう一つの目的は、前記抗体を個体に投与する段階を含む、癌の予防または治療方法を提供することにある。

【 0 0 1 4 】

本発明のもう一つの目的は、前記抗体を個体に投与する段階を含む、癌細胞の増殖、移動、または浸潤を抑制する方法を提供することにある。

10

【 0 0 1 5 】

本発明のもう一つの目的は、前記抗体に薬物が結合された、抗体 - 薬物結合体を提供することにある。

【 0 0 1 6 】

本発明のもう一つの目的は、前記抗体を含む、癌診断用組成物を提供することにある。

【 0 0 1 7 】

本発明のもう一つの目的は、前記組成物を含む、癌診断用キットを提供することにある。

【 0 0 1 8 】

本発明のもう一つの目的は、前記抗体を用いて、癌が疑われる個体から分離された生物学的試料から P A U F タンパク質を抗原抗体反応を通じて検出する段階を含む、癌の診断方法を提供することにある。

20

【 0 0 1 9 】

本発明のもう一つの目的は、(a) 癌細胞に癌の予防または治療候補物質を処理する段階 ; (b) 前記候補物質が処理された癌細胞において前記抗体を用いて、P A U F タンパク質のレベルを測定する段階 ; 及び (c) 前記段階 (b) の P A U F タンパク質のレベルが候補物質を処理していない癌細胞のものより減少する場合、前記 (a) 段階で処理した候補物質を癌の予防または治療物質として判断する段階を含む、癌の予防または治療物質のスクリーニング方法を提供することにある。

【発明の効果】

【 0 0 2 0 】

本発明の抗体は、P A U F タンパク質に高い特異度及び親和度を有して結合し、癌細胞の増殖、移動、浸潤及び生体内の成長を抑制するため、P A U F タンパク質が過発現されている癌のような疾患の診断及び治療の分野において有用に使用することができる。

30

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 1 】

【図 1】抗 P A U F タンパク質マウス抗体である 2 H 2 または 2 0 C 5 の P A U F タンパク質に対する親和度 (A) 及び特異度 (B) を示すグラフである。

【図 2】2 H 2 または 2 0 C 5 が既存の抗 P A U F タンパク質ヒト抗体である P M A b 8 3 と異なるエピトープを有していることを示すグラフであり、ビオチン標識 2 H 2 競合 E L I S A (Biotin-labeled 2H2 Competitive ELISA) の結果に関する。

40

【図 3】抗 P A U F タンパク質キメラ抗体である c P M A b 2 2 または c P M A b 2 0 5 の P A U F タンパク質に対する特異度を示すグラフである。ヒト抗体である P M A b 8 3 は比較群として使用した。

【図 4】前記 c P M A b 2 2 または c P M A b 2 0 5 の P A U F タンパク質に対する親和度を示すグラフであり、E L I S A で分析した結果に関する。ヒト抗体である P M A b 8 3 は比較群として使用した。

【図 5】前記 c P M A b 2 2 の癌細胞増殖抑制効果を示すグラフであり、W S T - 1 増殖アッセイ (proliferation assay) の結果に関する。膵臓癌細胞株 B x P C - 3 に対する効果を確認した。I g G は対照群、P M A b 8 3 は比較群として使用した。

【図 6】前記 c P M A b 2 2 の癌細胞移動 (migration) の抑制効果を示すグラフであり

50

、移動アッセイ (migration assay) の結果に関する。膵臓癌細胞株 CFPAC-1 及び膵臓癌の患者に由来する膵臓癌細胞 AMCPAC04 に対する効果を確認した。PMAb 83 は比較群として使用した。

【図 7】前記 cPMAb 22 の癌細胞浸潤 (invasion) 抑制効果を示すグラフであり、浸潤アッセイ (invasion assay) の結果に関する。膵臓癌細胞株 CFPAC-1 及び膵臓癌患者由来の膵臓癌細胞 AMCPAC04 に対する効果を確認した。PMAb 83 は比較群として使用した。

【図 8】本発明の一実施例に基づいて製造した、抗 PAUF タンパク質ヒト化抗体である 2H2-VH1-VL1、2H2-VH1-VL2 及び 2H2-VH1-VL3 の PAUF タンパク質に対する親和度を示すグラフであり、ELISA で分析した結果に関する。キメラ抗体である cPMAb 22 及びヒト抗体である PMAb 83 は比較群として使用した。

10

【図 9】前記 2H2-VH1-VL1、2H2-VH1-VL2 及び 2H2-VH1-VL3 の生産収率を示すイメージであり、ウェスタンブロット (western blot) で分析した結果に関する。1 は 2H2-VH1-VL1、2 は 2H2-VH1-VL2、3 は 2H2-VH1-VL3、4 は 2H2-VH2-VL1、5 は 2H2-VH2-VL2、6 は 2H2-VH2-VL3、7 は 2H2-VH3-VL1、8 は 2H2-VH3-VL2、9 は 2H2-VH3-VL3、及び 10 は 2H2-VH4-VL4 を意味し、A はタンパク質が含まれた培地を遠心分離していない状態、B は遠心分離を通じて破砕物 (debris) を除去し、0.22 µm のフィルタを用いて濾過した状態、及び C は Fc タンパク質を意味する。Fc タンパク質は対照群として使用した。

20

【図 10】前記ヒト化抗体 2H2-VH1-VL1、即ち、hPMAb 22 の PAUF タンパク質に対する特異度を示すグラフである。ヒト抗体である PMAb 83 は比較群として使用した。

【図 11】前記 hPMAb 22 の PAUF タンパク質に対する親和度を示すグラフであり、SPR (surface plasmon resonance) で分析した結果に関する。ヒト抗体である PMAb 83 は比較群として使用した。

【図 12】前記 hPMAb 22 の抗 PAUF タンパク質ヒト抗体である PMAb 83 と異なるエピトープを有していることを示すグラフであり、ピオチン標識 PMAb 83 競合 ELISA の結果に関する。

30

【図 13】前記 hPMAb 22 の癌細胞増殖抑制効果を示すグラフであり、WST-1 増殖アッセイの結果に関する。膵臓癌細胞株 CFPAC-1 に対する効果を確認した。IgG は対照群、PMAb 83 は比較群として使用した。

【図 14】前記 hPMAb 22 の癌細胞移動抑制効果を示すグラフであり、移動アッセイの結果に関する。膵臓癌患者由来の膵臓癌細胞 AMCPAC06 及び卵巣癌細胞株 OVCAR-5 に対する効果を確認した。PMAb 83 は比較群として使用した。

【図 15】前記 hPMAb 22 の癌細胞浸潤抑制効果を示すグラフであり、浸潤アッセイの結果に関する。膵臓癌患者由来の膵臓癌細胞 AMCPAC04 または AMCPAC06、及び卵巣癌細胞株 OVCAR-5 に対する効果を確認した。PMAb 83 は比較群として使用した。

40

【図 16】前記 hPMAb 22 の生体内 (in vivo) の抗癌効果を示すグラフであり、抗体の投与により減少した腫瘍の体積及び重量を示す。ジェムザール (Gemzar; Gemcitabine) は比較群として使用した。

【発明を実施するための形態】

【0022】

前記目的を達成するために、本発明の一つの態様は、PAUF (Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor) タンパク質に結合する抗体を提供する。

【0023】

本発明では、PAUF タンパク質に特異的に結合する配列番号 1 の重鎖 CDR1；配列番号 2 または 3 の重鎖 CDR2；及び配列番号 3、4 または 30 の重鎖 CDR3 を含む重

50

鎖可変領域及び配列番号5の軽鎖CDR1；配列番号6の軽鎖CDR2；及び配列番号7または31の軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域を含む抗体を開発し、これらは既存のPAUF抗体よりPAUFタンパク質に非常に高い親和度及び特異度を示し、膵臓癌、卵巣癌など多様な癌細胞の増殖、移動及び浸潤を抑制し、さらに、生体内に存在する癌の成長を抑制することを確認した。

【0024】

本発明の用語、「PAUF (Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor) タンパク質」とは、腫瘍の発達及び転移に関与するタンパク質を意味する。前記PAUFタンパク質は膵臓癌、卵巣癌、大腸癌、子宮頸癌などの癌細胞で過発現されることが特徴であり、これにより、癌の診断、治療などの標的になり得ることが報告されている (Cancer Sci. 2009 May, 100(5):828-36.; Biochem Biophys Res Commun. 2014 Nov, 454(1):144-50.(非特許文献2))。

10

【0025】

本発明の用語、「抗体」とは、免疫学的に、特定の抗原と反応性を有する免疫グロブリン分子を含む、抗原を特異的に認識する受容体の役割をするタンパク質の分子を意味する。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、全(whole)抗体及び抗体断片を全て含み、また、キメラ抗体及び2価(bivalent)または二重特異性分子(例えば、二重特異性抗体)、ジアポディ(diabody)、トリアポディ(triobody)及びテトラポディ(tetradody)を含む。併せて、FcRn(neonatal Fc receptor)に対する結合機能を有する短鎖抗体、スクラップ、抗体不変領域の誘導体及びタンパク質スクラップフォルドに基づいた人工抗体を含む。

20

【0026】

前記全抗体は、2個の全長の軽鎖及び2個の全長の重鎖を有する構造であり、それぞれの軽鎖は、重鎖とジスルフィド結合(disulfide bond)で連結されている。前記全抗体はIgA、IgD、IgE、IgM及びIgGを含め、IgGは亜型(subtype)であり、IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4を含む。

【0027】

前記抗体断片は、抗原結合機能を有している断片を意味し、Fc、Fd、Fab、Fab'、Fv、及びF(ab')₂などを含む。前記FcはFc受容体と呼ばれる細胞表面受容体と相互作用する抗体の尾部を意味する。前記FdはFab断片に含まれている重鎖部分を意味し、F(ab')₂はFd、Fab、Fab'及びFvを含む断片を意味する。前記Fabは軽鎖及び重鎖の可変領域と軽鎖の不変領域及び重鎖の最初の不変領域(CH1ドメイン)を有する構造で1個の抗原結合部位を有する。Fab'は重鎖CH1ドメインのC末端に1つ以上のシステイン残基を含むヒンジ領域(hinge region)を有するという点でFabと差異がある。F(ab')₂抗体は、Fab'のヒンジ領域のシステイン残基がジスルフィド結合をなしながら生成される。Fv(variable fragment)は、重鎖可変部位及び軽鎖可変部位のみを有している最小の抗体断片を意味する。ジスルフィドFv(dsFv; disulfide-stabilized Fv antibody fragment)は、ジスルフィド結合で重鎖可変部位と軽鎖可変部位が連結されており、短鎖Fv(scFv)は、一般にペプチドリンカーを通じて重鎖の可変領域と軽鎖の可変領域が共有結合で連結されている。このような抗体断片は、タンパク質加水分解酵素を利用して得ることができ(例えば、全抗体をパパインで制限切断するとFabを得ることができ、ペプシンで切断するとF(ab')₂断片を得ることができる)、好ましくは、遺伝子組換え技術を通じて作製することができる。

30

40

【0028】

一般に、免疫グロブリンは、重鎖(heavy chain)及び軽鎖(light chain)を有し、それぞれの重鎖及び軽鎖は、不変領域(constant region)及び可変領域(variable region)を含む。軽鎖及び重鎖の可変領域は、相補性決定領域と呼ばれる3つの多変可能な領域(complementarity-determining region、以下「CDR」と命名)及び4つの構造領域(framework region、以下「FR」と命名)を含む。各鎖のCDRは、主に抗原の

50

エピトープ (epitope) に結合する役割を果たし、典型的にN末端から開始して順次CDR1、CDR2、CDR3と命名される。また、各鎖のFRは、N末端から開始して順次にFR1、FR2、FR3、FR4と命名することができる。

【0029】

本発明において、重鎖の可変領域は「V_H」、軽鎖の可変領域は「V_L」と命名ことができ、重鎖のCDRはそれぞれ「V_H-CDR1」、「V_H-CDR2」、「V_H-CDR3」と、軽鎖のCDRはそれぞれ「V_L-CDR1」、「V_L-CDR2」、「V_L-CDR3」と、重鎖のFRはそれぞれ「V_H-FR1」、「V_H-FR2」、「V_H-FR3」、「V_H-FR4」と、軽鎖のFRは「V_L-FR1」、「V_L-FR2」、「V_L-FR3」、「V_L-FR4」と命名することができる。

10

【0030】

また、前記のような本発明の抗体が不変領域を含む場合、IgG、IgA、IgD、IgE、IgM由来またはこれらの組み合わせ (combination) またはこれらの混成 (hybrid) による不変領域を含むことができる。

【0031】

本発明の用語、「組み合わせ (combination)」とは、二量体または多量体を形成するとき、同一起源短鎖免疫グロブリン不変領域を暗号化するポリペプチドが相違する起源の短鎖ポリペプチドと結合を形成することを意味する。その例として、IgG、IgA、IgD、IgE及びIgMの不変領域からなるグループから選択された2つ以上の不変領域から二量体または多量体を形成することができる。

20

【0032】

本発明の用語、「ハイブリッド (hybrid)」とは、短鎖免疫グロブリン重鎖不変領域内に2つ以上の相違する起源の免疫グロブリン重鎖不変領域に該当する配列が存在することを意味し、その例としてIgG、IgA、IgD、IgE及びIgMのCH1、CH2、CH3、及びCH4からなるグループから選択される1個~4個のドメインからなるドメインのハイブリッドが可能である。

【0033】

また、本発明において抗体は、可変領域及び不変領域の由来が同一または異なってもよく、CDR、これを除いた可変領域及び不変領域の由来が同一または異なってもよい。

30

【0034】

本発明の用語、「PAUF (Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor) タンパク質に特異的に結合する抗体」とは、PAUFタンパク質に結合してPAUFタンパク質の活性を阻害する抗体を意味する。

【0035】

具体的には、前記PAUFタンパク質に特異的に結合する抗体は、マウス抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体であってもよい。

【0036】

具体的には、本発明の抗体は、配列番号1の重鎖CDR1；配列番号2または39の重鎖CDR2；及び配列番号3、4または30の重鎖CDR3を含む重鎖可変領域及び配列番号5の軽鎖CDR1；配列番号6の軽鎖CDR2；及び配列番号7または31の軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域を含むことができるが、これらに限定されない。

40

【0037】

また、本発明の抗体は、配列番号17、28、または37のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域；及び配列番号18、29、または38のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含むことができるが、これらに限定されない。

【0038】

また、本発明の抗体は、配列番号8、19、または32の重鎖FR (Framework region) 1；配列番号9または20の重鎖FR2；配列番号10、21、または33の重鎖FR3；及び配列番号11、12、22、23、または34の重鎖FR4を含む重鎖可変領域

50

及び配列番号 1 3、2 4、または 3 5 の軽鎖 F R 1；配列番号 1 4 または 2 5 の軽鎖 F R 2；配列番号 1 5 または 2 6 の軽鎖 F R 3；及び配列番号 1 6、2 7 または 3 6 の軽鎖 F R 4 を含む軽鎖可変領域を含むことができるが、これらに限定されない。

【0039】

本発明の一例として、既存の P A U F 抗体に比べて P A U F タンパク質に対する親和度及び特異度が向上した本発明の抗体は、

【0040】

具体的には、配列番号 1 の重鎖 C D R 1；配列番号 2 または 3 9 の重鎖 C D R 2；及び配列番号 3 の重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域及び配列番号 5 の軽鎖 C D R 1；配列番号 6 の軽鎖 C D R 2；及び配列番号 7 の軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含むか、

10

【0041】

配列番号 1 の重鎖 C D R 1；配列番号 2 または 3 9 の重鎖 C D R 2；及び配列番号 4 の重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域及び配列番号 5 の軽鎖 C D R 1；配列番号 6 の軽鎖 C D R 2；及び配列番号 7 の軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含むか、または

【0042】

配列番号 8 の重鎖 F R 1；配列番号 9 の重鎖 F R 2；配列番号 1 0 の重鎖 F R 3；及び配列番号 1 1 の重鎖 F R 4 を含む重鎖可変領域及び配列番号 1 3 の軽鎖 F R 1；配列番号 1 4 の軽鎖 F R 2；配列番号 1 5 の軽鎖 F R 3；及び配列番号 1 6 の軽鎖 F R 4 を含む軽鎖可変領域を含むか、

【0043】

20

配列番号 8 の重鎖 F R 1；配列番号 9 の重鎖 F R 2；配列番号 1 0 の重鎖 F R 3；及び配列番号 1 2 の重鎖 F R 4 を含む重鎖可変領域及び配列番号 1 3 の軽鎖 F R 1；配列番号 1 4 の軽鎖 F R 2；配列番号 1 5 の軽鎖 F R 3；及び配列番号 1 6 の軽鎖 F R 4 を含む軽鎖可変領域を含むことができ、

【0044】

より具体的には、配列番号 1 7 のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号 1 8 のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含むことができるが、これらに限定されない。

【0045】

本発明の一実施例では、配列番号 1 7 のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号 1 8 のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体を「2H2」または「cPMAb2」と命名した。

30

【0046】

また、本発明の抗体は、

具体的には、配列番号 1 の重鎖 C D R 1；配列番号 2 または 3 9 の重鎖 C D R 2；及び配列番号 3 の重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域及び配列番号 5 の軽鎖 C D R 1；配列番号 6 の軽鎖 C D R 2；及び配列番号 7 の軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含むか、

【0047】

配列番号 1 の重鎖 C D R 1；配列番号 2 または 3 9 の重鎖 C D R 2；及び配列番号 4 の重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域及び配列番号 5 の軽鎖 C D R 1；配列番号 6 の軽鎖 C D R 2；及び配列番号 7 の軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含むか、または

40

【0048】

配列番号 1 9 の重鎖 F R 1；配列番号 2 0 の重鎖 F R 2；配列番号 2 1 の重鎖 F R 3；及び配列番号 2 2 の重鎖 F R 4 を含む重鎖可変領域及び配列番号 2 4 の軽鎖 F R 1；配列番号 2 5 の軽鎖 F R 2；配列番号 2 6 の軽鎖 F R 3；及び配列番号 2 7 の軽鎖 F R 4 を含む軽鎖可変領域を含むか、

【0049】

配列番号 1 9 の重鎖 F R 1；配列番号 2 0 の重鎖 F R 2；配列番号 2 1 の重鎖 F R 3；及び配列番号 2 3 の重鎖 F R 4 を含む重鎖可変領域及び配列番号 2 4 の軽鎖 F R 1；配列番号 2 5 の軽鎖 F R 2；配列番号 2 6 の軽鎖 F R 3；及び配列番号 2 7 の軽鎖 F R 4 を含む軽鎖可変領域を含むことができ、

50

【 0 0 5 0 】

より具体的には、配列番号 28 のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号 29 のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含むことができるが、これらに限定されない。

【 0 0 5 1 】

本発明の一実施例では、配列番号 28 のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号 29 のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体を「h P M A b 2 2」と命名した。

【 0 0 5 2 】

また、本発明の抗体は、

具体的には、配列番号 1 の重鎖 C D R 1 ; 配列番号 2 または 3 9 の重鎖 C D R 2 ; 及び配列番号 3 0 の重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域及び配列番号 5 の軽鎖 C D R 1 ; 配列番号 6 の軽鎖 C D R 2 ; 及び配列番号 3 1 の軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含むか、または

10

【 0 0 5 3 】

配列番号 3 2 の重鎖 F R 1 ; 配列番号 9 の重鎖 F R 2 ; 配列番号 3 3 の重鎖 F R 3 ; 及び配列番号 3 4 の重鎖 F R 4 を含む重鎖可変領域及び配列番号 3 5 の軽鎖 F R 1 ; 配列番号 1 4 の軽鎖 F R 2 ; 配列番号 1 5 の軽鎖 F R 3 ; 及び配列番号 3 6 の軽鎖 F R 4 を含む軽鎖可変領域を含むことができ、

【 0 0 5 4 】

より具体的には、配列番号 37 のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号 38 のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含むことができるが、これらに限定されない。

20

【 0 0 5 5 】

本発明の一実施例では、配列番号 37 のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域及び配列番号 38 のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗体を「2 0 C 5」または「c P M A b 2 0 5」と命名した。

【 0 0 5 6 】

本発明の具体的な一実施例では、P A U F タンパク質に結合するマウス抗体 2 H 2 または 2 0 C 5、そのキメラ抗体 c P M A b 2 2 または c P M A b 2 0 5、及びそのヒト化抗体 h P M A b 2 2 を開発し、前記抗体は、従来の P A U F 抗体よりも P A U F タンパク質に高い特異度及び親和度で結合することを確認した(図 1、3、4、8 ~ 11)。また、前記抗体は、膵臓癌細胞株と膵臓癌患者に由来する膵臓癌細胞だけでなく、卵巢癌細胞株に対しても癌細胞の増殖、移動及び浸潤を抑制し、生体内に存在する膵臓癌の成長も抑制することができることを確認した。さらに、前記抗体の癌治療効果は、従来の P A U F タンパク質特異的ヒト抗体である P M A b 8 3 と類似またはさらに優れることを確認した(図 5 ~ 7、及び図 13 ~ 16)。

30

【 0 0 5 7 】

これは、本発明の P A U F タンパク質に結合する抗体は、P A U F タンパク質の認知が必要な分野、例えば、P A U F タンパク質が過発現された疾患の診断または治療などに有用に使用できることを示唆するものである。

【 0 0 5 8 】

もう一つの態様は、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び前記発現ベクターが導入された形質転換体を提供する。

40

【 0 0 5 9 】

そのとき、前記抗体の説明については、前述した通りである。

【 0 0 6 0 】

本発明において、前記抗体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、特にこれに限定されないが、哺乳類細胞(例えば、ヒト、サル、ウサギ、ラット、ハムスター、マウス細胞など)、植物細胞、酵母細胞、昆虫細胞またはバクテリア細胞(例えば、大腸菌など)を含む真核または原核細胞において、前記ポリヌクレオチドを複製及び/または発現し得るベクターであってもよく、好ましくは宿主細胞において、前記ヌクレオチドが発現されるように、適切なプロモーターに作動可能に連結され、少なくとも一つの選別マ

50

ーカーを含むベクターであってもよい。その例としてファージ、プラスミド、コスミド、ミニ染色体、ウイルスまたはレトロウイルスベクターなどに前記ポリヌクレオチドが導入された形態であってもよい。

【0061】

前記抗体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、前記抗体の重鎖または軽鎖をコードするポリヌクレオチドをそれぞれ含む発現ベクターまたは重鎖または軽鎖をコードするポリヌクレオチドを全て含む発現ベクターであってもよい。

【0062】

本発明において、前記発現ベクターが導入された形質転換体は、特に限定されないが、前記発現ベクターが導入されて形質転換された大腸菌、ストレプトマイセス、ネズミチフス菌などのバクテリア細胞；酵母細胞；ピキア・パストリスなどの菌類細胞；ショウジョウバエ、スポドプテラ Sf 9 細胞などの昆虫細胞；CHO（中国ハムスター卵巣細胞、chinese hamster ovary cells）、SP2/0（マウス骨髄腫）、ヒトリンパ芽球（human lymphoblastoid）、COS、NSO（マウス骨髄腫）、293T、ボウメラノーマ細胞、HT-1080、BHK（ベビーハムスター腎臓細胞、baby hamster kidney cells）、HEK（ヒト胚腎臓細胞、human embryonic kidney cells）、PERC.6（ヒト網膜細胞）などの動物細胞；または植物細胞であってもよい。

【0063】

本発明の用語、「導入」とは、前記抗体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを宿主細胞に伝達する方法を意味する。このような導入は、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション法、ポリブレン媒介形質感染法、電気ショック法、微細注射法、リポソーム融合法、リポフェクタミン及び原形質体融合法などの当分野において公知となった種々の方法により行うことができる。また、形質導入は、感染（infection）を手段としてウイルス粒子を使用して目的物を細胞内に伝達させることを意味する。併せて、遺伝子のボンバードメント（bombardment）などによりベクターを宿主細胞内に導入することができる。本発明において、導入は形質転換と混用して使用される。

【0064】

もう一つの態様は、前記抗体を含む、癌の予防または治療用医薬組成物を提供する。

【0065】

前記抗体は、癌で過発現されたPAUFタンパク質に非常に高い親和度及び特異度を示し、膵臓癌、卵巣癌など多様な癌細胞の増殖、移動、浸潤を抑制し、さらに、生体内に存在する癌の成長を抑制することができるため、PAUFタンパク質が過発現された疾患、例えば、癌の予防または治療効果を示すことができる。そのとき、前記抗体の説明については、前述した通りである。

【0066】

本発明の用語、「癌」とは、身体組織の自律的な過剰成長により非正常的に増殖された塊であり、本発明の抗体により予防または治療し得る癌であれば、その種類に制限なく含むが、具体的な例として、膵臓癌、胃癌、大腸癌、胆道癌、食道癌、直腸癌、口腔癌、咽頭癌、喉頭癌、肺癌、結腸癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、前立腺癌、精巣癌、膀胱癌、腎臓癌、肝臓癌、骨癌、結合組織癌、皮膚癌、脳腫瘍、甲状腺癌、白血病、ホジキン（Hodgkin）疾患、リンパ腫、及び多発性骨髄腫血液癌であってもよい。

【0067】

本発明の用語、「予防」とは、前記組成物の投与により癌の発症を抑制したり、遅延させる全ての行為を意味する。

【0068】

本発明の用語、「治療」とは、前記組成物の投与により癌の症状が好転したり、有利に変更されるすべての行為を意味する。

【0069】

前記医薬組成物は、薬学的に許容可能な担体をさらに含むことができ、前記担体は、非自

10

20

30

40

50

然的担体 (non-naturally occurring carrier) を含むことができる。

【0070】

本発明の用語、「薬学的に許容可能な担体」とは、生物体を刺激せずに投与化合物の生物学的活性及び特性を阻害しない担体または希釈剤を意味する。液状溶液に製剤化される組成物に許容される薬学的担体としては、滅菌及び生体に適したものとして、生理食塩水、滅菌水、リンゲル液、緩衝食塩水、アルブミン注射溶液、デキストロース溶液、マルトデキストリン溶液、グリセロール、エタノール及びこれら成分の一つ以上の成分を混合して使用することができ、必要に応じて抗酸化剤、緩衝液、静菌剤など他の通常の添加剤を添加することができる。また、希釈剤、分散剤、界面活性剤、結合剤及び潤滑油を付加的に添加して水溶液、懸濁液、乳濁液などのような注射用剤形、丸薬、カプセル、顆粒または錠剤に製剤化することができる。

10

【0071】

前記薬学的組成物は、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、懸濁剤、内用液剤、乳剤、シロップ剤、滅菌された水溶液、非水性溶剤、懸濁剤、乳剤、凍結乾燥製剤及び坐剤からなる群から選択されるいずれか一つの剤形を有することができ、経口または非経口の種々の剤形であってもよい。製剤化する場合には、通常使用される充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩解剤、界面活性剤などの希釈剤または賦形剤を使用して調製される。経口投与のための固形製剤には、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤などが含まれ、このような固形製剤は、一つ以上の化合物に少なくとも一つ以上の賦形剤、例えば、澱粉、炭酸カルシウム、スクロース (sucrose) またはラクトース (lactose)、ゼラチンなどを混ぜて調製される。また、単純な賦形剤以外にステアリン酸マグネシウム、タルクなどのような潤滑剤も使用される。経口投与のための液状製剤としては、懸濁剤、内用液剤、乳剤、シロップ剤などが該当するが、よく使用される単純希釈剤である水、リキッドパラフィン以外に種々の賦形剤、例えば、湿潤剤、甘味剤、芳香剤、保存剤などが含まれてもよい。非経口投与のための製剤には、滅菌された水溶液、非水性溶剤、懸濁剤、乳剤、凍結乾燥製剤、坐剤が含まれる。非水性溶剤、懸濁溶剤には、プロピレングリコール (propylene glycol)、ポリエチレングリコール、オリーブオイルのような植物油、オレイン酸エチルのような注射可能なエステルなどが使用されてもよい。坐剤の基剤としては、ウイテプゾール (witepsol)、マクロゴール、ツイン (tween) 61、カカオ脂、ラウリン脂、グリセロゼラチンなどが使用されてもよい。

20

30

【0072】

また、前記薬学的組成物は、薬学的に有効な量で投与することができる。

【0073】

本発明において、用語、「薬学的に有効な量」とは、医学的治療に適用可能な合理的な利益/リスク比で疾患を治療するのに十分な量を意味し、有効容量レベルは、個体の種類及び重症度、年齢、性別、癌の種類、薬物の活性、薬物に対する敏感度、投与時間、投与経路及び排出率、治療期間、同時に使用される薬物を含む要素及びその他の医学分野でよく知られている要素に応じて決定することができる。本発明の組成物は、個別の治療剤として投与するか、他の治療剤と併用して投与することができ、従来の治療剤とは、順次または同時に投与することができる。そして、単一または多重で投与することができる。前記要素を全て考慮し、副作用なしに最小限の量で最大の効果を得る量を投与することが重要であり、当業者により容易に決定することができる。

40

【0074】

本発明の具体的な一実施例では、PAUFタンパク質に高い特異度及び親和度で結合する抗体は、膵臓癌細胞株と膵臓癌患者に由来する膵臓癌細胞だけでなく、卵巣癌細胞株に対しても癌細胞の増殖、移動及び浸潤を抑制し、生体内に存在する膵臓癌の成長も抑制することができることを確認した。さらに、前記抗体の癌治療効果は、従来のPAUFタンパク質特異的ヒト抗体であるPMAb83と類似またはさらに優れることを確認した(図5~7、及び図13~16)。

【0075】

50

これは、本発明の P A U F タンパク質に結合する抗体は、癌の予防または治療用途として有用に使用できることを示唆するものである。

【 0 0 7 6 】

もう一つの態様は、前記抗体を個体に投与する段階を含む、癌の予防または治療方法を提供する。

【 0 0 7 7 】

そのとき、前記抗体、癌、予防及び治療の説明については、前述した通りである。

【 0 0 7 8 】

本発明の用語、「個体」とは、癌が発症する可能性があるか、または発症したマウス、牛、豚、羊、鶏、犬、ヒトなどを含む哺乳動物、鳥類などを含み、本発明の医薬組成物の投与により癌が治療される個体は制限なく含む。

10

【 0 0 7 9 】

本発明の癌の予防または治療方法において、前記組成物を投与する投与経路及び投与方法は、特に制限されず、目的とする当該部位に前記組成物が到達することができる限り、任意の投与経路及び投与方法に従うことができる。

【 0 0 8 0 】

具体的には、前記組成物は、経口または非経口の多様な経路を通じて投与することができ、その投与経路の非限定的な例としては、口腔、直腸、局所、静脈内、腹腔内、筋肉内、動脈内、経皮、鼻側内または吸入などを通じて投与されることが挙げられる。また、前記組成物は、活性物質が標的細胞に移動することができる任意の装置により投与することができる。

20

【 0 0 8 1 】

もう一つの態様は、本発明の抗体を個体に投与する段階を含む、癌細胞の増殖、移動または浸潤を抑制する方法を提供することである。

【 0 0 8 2 】

そのとき、前記抗体、個体及び癌の説明については、前述した通りである。

【 0 0 8 3 】

前記抗体は、癌で過発現された P A U F タンパク質に非常に高い親和度及び特異度を示し、膵臓癌、卵巣癌など多様な癌細胞の増殖、移動及び浸潤を抑制し、さらに、生体内に存在する癌の成長を抑制することができるため、癌細胞の増殖、移動または浸潤を抑制する方法に有用に使用することができる。

30

【 0 0 8 4 】

もう一つの態様は、本発明の抗体に薬物が結合された、抗体 - 薬物結合体を提供する。

【 0 0 8 5 】

そのとき、前記抗体の説明については、前述した通りである。

【 0 0 8 6 】

本発明の用語、「抗体 - 薬物結合体」とは、抗体が有する標的特異性、血液循環中の毒性がないこと、及び薬物動態学的利点を利用して抗体に薬物を結合させた形態の物質を意味する。このような抗体 - 薬物結合体は、通常、モノクローナル抗体 - リンカー - 薬物、3つの構成要素を含め、抗体が標的とする細胞、特に癌細胞に薬物を提供して抗体による治療効果を上昇させることができる。

40

【 0 0 8 7 】

本発明の用語、「薬物」とは、抗体に直接または間接的に結合され、効果的に前記抗体が標的とする疾患の治療をもたらす物質を意味する。抗体と結合し得る薬物には、放射性核種、薬剤、リンホカイン、毒素、二重特異的抗体などを含む。また、前記した放射性核種には、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl 、 ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re などがあり、これに制限されない。また、前記薬剤または毒素の例として、エトポシド、テニポシド、アドリアマイシン、ダウノマイシン、カルミノマイシン、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン類、シス - 白金及びシス - 白金同族体、プレオマイシン類、エスペラマイシン類、5 - フ

50

ルオロウラシル、メルファラン及びその他の窒素マスタードなどが挙げられるが、前記例により本願発明の抗体に結合し得る薬剤または毒素が制限されるものではない。

【0088】

このような抗体-薬物結合体は、当業界において公知となった多様な抗体-薬物結合体の製造方法を通じて製造することができる。

【0089】

もう一つの態様は、本発明の抗体を含む、癌診断用組成物を提供する。

【0090】

そのとき、前記抗体及び癌の説明については、前述した通りである。

【0091】

本発明の癌診断用組成物は、多様な種類の癌細胞で過発現されるP A U Fタンパク質に特異的に結合する抗体を含むため、P A U Fタンパク質の発現有無や発現の程度と関連した疾患、例えば癌の診断に有用に使用することができる。

【0092】

もう一つの態様は、前記組成物を含む、癌診断用キットを提供する。

【0093】

そのとき、前記組成物及び癌の説明については、前述した通りである。

【0094】

本発明の癌診断用キットは、分析方法に適した一種類またはそれ以上の異なる構成成分を有する組成物、溶液または装置をさらに含めて構成することができる。

【0095】

もう一つの態様は、本発明の抗体を用いて癌が疑われる個体から分離された生物学的試料からP A U Fタンパク質を抗原抗体反応を通じて検出する段階を含む、癌の診断方法を提供する。

【0096】

そのとき、前記抗体、個体、P A U Fタンパク質及び癌の説明については、前述した通りである。

【0097】

P A U Fタンパク質は、多様な種類の癌細胞で過発現されると知られているため、P A U Fタンパク質に高い特異度及び親和度で結合する本発明の抗体は、P A U Fタンパク質の発現有無や発現の程度と関連した疾患、例えば、癌の診断に有用に使用することができる。

【0098】

前記癌の診断方法は、本発明のP A U Fに特異的な抗体を癌が疑われる個体の分離された生物学的試料と反応させ、抗原抗体複合体の形成を検出することによりP A U Fタンパク質を検出ことができ、これにより、癌を診断することができる。

【0099】

具体的には、(a)前記抗体を癌が疑われる個体の分離された生物学的試料に処理してP A U Fタンパク質を抗原抗体反応を通じて検出する段階；(b)前記(a)から検出されたP A U Fタンパク質のレベルを対照群と比較し、対照群に比べてP A U Fタンパク質のレベルが高ければ、癌患者と判定する段階を含む、癌の診断方法であってもよい。

【0100】

本発明の用語、「生物学的試料」とは、組織、細胞、全血、血清、血漿、組織解剖試料(脳、皮膚、リンパ節、脊髄など)、細胞培養上澄み液、破裂された真核細胞及び細菌の発現系などが挙げられるが、これに限定されるものではない。これらの生物学的試料を操作したり、操作していない状態で、本発明の抗体と反応させてP A U Fタンパク質の存在または癌の有無を確認することができる。

【0101】

本発明の用語、「抗原抗体複合体」とは、試料中のP A U Fタンパク質抗原とこれを認知する本発明の抗体の結合物を意味し、このような抗原抗体複合体の形成は、比色法(Colo

10

20

30

40

50

rmetric method)、電気化学法 (Electrochemical method)、蛍光法 (Fluorimetric method)、発光法 (Luminometric method)、粒子計数法 (Particle counting method)、視覚的評価法 (Visual assessment) またはシンチレーション計数法 (Scintillation counting method) などの任意の方法で検出することができる。しかし、必ずしもこれらだけに限定されず、多様な応用と適用が可能である。

【0102】

前記抗原抗体複合体を検出するために、種々の標識体を使用することができる。具体的な例として、酵素、蛍光物、リガンド、発光物、微小粒子または放射性同位元素等を使用することができるが、これに限定されるものではない。そのとき、検出標識体として使用される酵素としては、アセチルコリンエステラーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ、 β -ラクタマーゼなどを含み、蛍光物としてはフルオレセイン、 Eu^{3+} 、 Eu^{3+} キレートまたはクリプテートなどを含み、リガンドとしてはビオチン誘導体などを含み、発光物としてはアクリジニウムエステル、イソルミノール誘導体などを含み、微小粒子としてはコロイド金、着色されたラテックスなどを含み、放射性同位元素としては ^{57}Co 、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{125}I -ボントン (Bonton) ハンター (Hunter) 試薬などを含む。

10

【0103】

もう一つの態様は、(a) 癌細胞に癌の予防または治療候補物質を処理する段階；(b) 前記候補物質が処理された癌細胞において、本発明の抗体を用いて、PAUFタンパク質のレベルを測定する段階；及び(c) 前記段階(b)のPAUFタンパク質のレベルが候補物質を処理していない癌細胞のものより減少する場合、前記(a)段階で処理した候補物質を癌の予防または治療物質と判断する段階を含む、癌の予防または治療物質のスクリーニング方法を提供する。

20

【0104】

そのとき、前記抗体、PAUFタンパク質及び癌の説明については、前述した通りである。

【0105】

本発明の用語、「癌の予防または治療候補物質」とは、癌を治療し得ると予想される物質であり、直接または間接的に癌を好転または改善させることができると予想される物質であれば制限なく使用可能であり、化合物、遺伝子またはタンパク質などの治療可能予想物質をすべて含む。

30

【0106】

本発明において、癌細胞に癌の予防または治療候補物質を処理する前記(a)段階は、当業界において公知となった方法を使用して実行することができる。具体的な例として、癌細胞に前記候補物質を処理して共に培養するか、または癌細胞を含む生体内に投与することにより、前記候補物質を処理することができるが、これに限定されるものではなく、当業者であれば、本発明の目的に合う方法を使用することができる。

【0107】

また、PAUFタンパク質のレベルを測定する前記(b)段階は、当業者に知られている如何なる方法でも使用可能である。具体的な例として、ウェスタンブロット (Western blot)、共免疫沈降アッセイ (Co-Immunoprecipitation assay)、ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)、免疫組織染色 (Immunostaining) 及びフローサイトメトリー分析法 (Flowcytometry analysis) などを使用することができるが、これに限定されるものではなく、当業者であれば、本発明の目的に合う方法を使用することができるだろう。

40

【0108】

最後に、前記(c)段階は、前記候補物質を癌の予防または治療物質として使用できるかどうかを判断する段階であり、PAUFタンパク質は、癌細胞で過発現され、癌細胞の増殖、移動、浸潤、成長などを促進するため、PAUFタンパク質のレベルを減少させる候補物質は、癌の予防または治療物質として使用することができる。

50

【 0 1 0 9 】

以下、実施例を通じて本発明をさらに詳しく説明する。これら実施例は、単に本発明を例示するためのものであり、本発明の範囲がこれら実施例により制限されるものとは解釈されない。

【 0 1 1 0 】

実施例 1 . 抗 P A U F タンパク質マウス抗体の発掘及び特性確認

実施例 1 - 1 . 2 H 2 及び 2 0 C 5 の発掘

P A U F タンパク質を標的とする抗体を開発するために、まず P U A F タンパク質に結合するマウスモノクローナル抗体を用いた。

【 0 1 1 1 】

具体的には、抗 P A U F タンパク質マウス抗体は、以下のような方法で発掘した。P A U F タンパク質をマウスに注射した後、抗原 P A U F タンパク質に対する抗体が生成されると、マウスの脾臓から B リンパ球を分離した。分離した B リンパ球を高倍率に希釈して P A U F タンパク質がコーティングされている 9 6 ウェルプレートに 1 つの B リンパ球のみが入るようにした。その後、H R P が標識された抗マウス抗体を用いて P A U F タンパク質と結合する B リンパ球をスクリーニングした。

【 0 1 1 2 】

その結果、2 H 2、4 E 6、1 1 G 6 及び 2 0 C 5 の 4 種の抗 P A U F タンパク質マウスモノクローナル抗体を発掘することができ、その重鎖及び軽鎖可変領域、C D R、及び F R 配列は下記表 1 及び 2 に記載した。

【 0 1 1 3 】

10

20

30

40

50

【表 1】

抗PAUFタンパク質マウス抗体、「2H2」のアミノ酸配列

抗体名	区分	配列	配列番号
2H2	重鎖可変領域 (Heavy chain variable region;V _H)	QVQLKQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIMHVKQRP EQGLEWIGWIDPENGNTIYDPKFQGKASITADTSSNTAYLQ LSSLTSEDVAVYYCARRAITTATAWFAYWGQGLTVSA	17
	V _H -CDR1	GFNIKDYI	1
	V _H -CDR2	IDPENGNT	2
	V _H -CDR3	ARRAITTATAWFA	3
	V _H -CDR3	ARRAITTATAWFAY	4
	V _H -FR1	QVQLKQSGAELVRPGALVKLSCKAS	8
	V _H -FR2	MHVKQRPQGLEWIGW	9
	V _H -FR3	IYDPKFQGKASITADTSSNTAYLQSSLTSEDVAVYYC	10
	V _H -FR4	YWGQGLTVSA	11
	V _H -FR4	WGQGLTVSA	12
	軽鎖可変領域 (Light chain variable region;V _L)	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNSRTRKNYLAW YQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTIS SVQAEDLAVYYCKQSYNLYTFGAGTKLELK	18
	V _L -CDR1	QSLNSRTRKNY	5
	V _L -CDR2	WAS	6
	V _L -CDR3	KQSYNLY	7
	V _L -FR1	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSS	13
	V _L -FR2	LAWYQQKPGQSPKLLIY	14
	V _L -FR3	TRESGVPDRFTGSGSGTDFLTISVQAEDLAVYYC	15
V _L -FR4	TFGAGTKLELK	16	

【 0 1 1 4 】

10

20

30

40

50

【表 2】

抗PAUFタンパク質マウス抗体、「20C5」のアミノ酸配列

抗体名	区分	配列	配列番号
20C5	重鎖可変領域 (Heavy chain variable region;V _H)	QVQLKESGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIMHWVKQRPE QGLEWIGWIDPEHGNTIYDPKFQGKASLTADTSSNTAYLQLS SLTSEDTAVYYCARRGWLPAWFAYWGQGLVTVSA	37
	V _H -CDR1	GFNIKDYI	1
	V _H -CDR2	IDPEHGNT	39
	V _H -CDR3	ARRGWLPAWFAY	30
	V _H -FR1	QVQLKESGAELVRPGALVKLSCKAS	32
	V _H -FR2	MHWVKQRPEQGLEWIGW	9
	V _H -FR3	IYDPKFQGKASLTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYC	33
	V _H -FR4	WGQGLVTVSA	34
	軽鎖可変領域 (Light chain variable region;V _L)	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTLSCKSSQSLLSRTRKNYLAWY QQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVV QAEDLAVYYCKQSYNLYTFGGGTKLEIK	38
	V _L -CDR1	QSLLSRTRKNY	5
	V _L -CDR2	WAS	6
	V _L -CDR3	KQSYNLYT	31
	V _L -FR1	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTLSCKSS	35
	V _L -FR2	LAWYQQKPGQSPKLLIY	14
	V _L -FR3	TRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVVQAEDLAVYYC	15
	V _L -FR4	FGGGTKLEIK	36

10

20

30

【0115】

実施例 1 - 2 . P U A F タンパク質に対する特異度の確認

前記実施例 1 - 1 で発掘した 2 H 2、4 E 6、1 1 G 6 及び 2 0 C 5 の 4 種の抗体中、P U A F タンパク質に親和度が最も高い抗体を発掘するために、次のような方法を行った。

【0116】

具体的には、抗原抗体の親和度をテストするために間接 E L I S A (Indirect ELISA) を行った。P A U F をコーティングした免疫プレート (Immuno-plate) に 2 H 2、4 E 6、1 1 G 6 及び 2 0 C 5 の 4 種の抗体を濃度別に処理した後、H R P が標識された抗マウス抗体を用いて O D 値を測定した。そのとき、O D 値が高いほど P A U F と抗体の親和力が高いことを意味する。また、P A U F に対する結合親和性が高い抗 P A U F マウスモノクローナル抗体の他の抗原タンパク質との非特異的結合を測定するために、免疫プレートに P A U F と不特定の抗原をコーティングして間接 E L I S A を行った。

40

【0117】

その結果、図 1 の A 及び B で見られるように、他の抗体に比べて、2 H 2 または 2 0 C 5 の 2 種の抗体が P A U F タンパク質に、より高い親和度で結合し、また、P U A F タンパク質に対して非常に高い特異度を有していることを確認した。

【0118】

実施例 1 - 3 . エピトープ (epitope) の確認

前記実施例 1 - 1 で発掘した 2 H 2 または 2 0 C 5 のエピトープを確認するために、まず、韓国登録特許公報第 1 0 - 1 0 9 8 1 8 6 号 (特許文献 1) に公知となった P A U F 特

50

異なるヒトモノクローナル抗体である 8 F 3、即ち、P M A b 8 3 と同一なエピトープを有するかを確認した。

【 0 1 1 9 】

具体的には、ビオチン標識 2 H 2 競合 E L I S A (Biotin-labeled 2H2 Competitive E L I S A) を行った。免疫プレートに P A U F をコーティングした後、ビオチンが標識された 2 H 2 とビオチンが標識されていない非標識抗体を 1 : 0、1 : 5 0、1 : 1 0 0、1 : 2 0 0 の割合で入れた。2 次抗体としては、ストレプトアビジン (streptavidin) - H R P を使用してそれぞれの抗体の O D 値を測定することによりエピトープを分析した。そのとき、2 つの抗体が類似したエピトープを有する場合、非標識抗体の濃度が増加するにつれて O D 値が低くなるが、2 つの抗体のエピトープが異なる場合、非標識抗体の濃度が増加しても O D 値は変化がない。

10

【 0 1 2 0 】

その結果、図 2 で見られるように、2 H 2 または 2 0 C 5 は類似したエピトープを認識し、P M A b 8 3 と異なるエピトープを有することを確認した。

【 0 1 2 1 】

実施例 2 . 抗 P A U F タンパク質キメラ抗体 (chimeric antibodies) の製造及び特性の確認

実施例 2 - 1 . c P M A b 2 2 または c P M A b 2 0 5 の製造

前記実施例 1 で発掘した 2 H 2 または 2 0 C 5 マウス抗体の拒否反応を最小限に抑えるために、前記抗体の可変領域は維持し、不変領域のみヒト由来のタンパク質に変えたキメラ抗体を製造した。

20

【 0 1 2 2 】

具体的には、2 H 2 または 2 0 C 5 マウス抗体を生産するハイブリドーマ (hybridoma) 細胞から全 m R N A を分離して c D N A を合成した。その後、P C R を通じて、各抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域 (variable region) のみ増幅させて D N A を得た。P C R を通じて得られた 2 H 2 または 2 0 C 5 の可変領域をヒトの重鎖及び軽鎖の不変領域を有するベクターにクローニングした。ベクターにクローニングした 2 H 2 と 2 0 C 5 を D N A 電気泳動を通じて確認した後、配列を分析し、グループを分けた。同じ配列を有するクローンを除去した後、各抗体の重鎖及び軽鎖を選別した。選別された配列を H E K 2 9 3 細胞で発現させ、最終的に、マウスの可変領域とヒトの不変領域を有するキメラ抗体 2 種を作製した。

30

【 0 1 2 3 】

その結果、2 H 2 のキメラ抗体である c P M A b 2 2、または 2 0 C 5 のキメラ抗体である c P M A b 2 0 5 を製造することができた。また、その重鎖及び軽鎖可変領域、C D R、及び F R 配列は、前記表 1 及び 2 に記載した 2 H 2 または 2 0 C 5 と同一であることを確認した。

【 0 1 2 4 】

実施例 2 - 2 . P U A F タンパク質に対する特異度の確認

前記実施例 2 - 1 で製造した c P M A b 2 2 または c P M A b 2 0 5 の P U A F タンパク質に対する特異度を確認するために、次のような方法を行った。

40

【 0 1 2 5 】

具体的には、間接 E L I S A を行った。P A U F - H i s タンパク質と多数の不特定の抗原タンパク質をコーティングした免疫プレートにキメラ抗体 c P M A b 2 2 と c P M A b 2 0 5 及びヒト抗体 P M A b 8 3 を 0、1、5 μ g / m l で入れた後、2 次抗体である抗ヒトカッパ軽鎖 - H R P (a n t i - h u m a n k a p p a l i g h t c h a i n - H R P) を使用して O D 値を測定した。

【 0 1 2 6 】

その結果、図 3 で見られるように、c P M A b 2 2 または c P M A b 2 0 5 は P U A F タンパク質に対して非常に高い特異度を有しており、特に、既存の抗 P A U F ヒト抗体である P M A b 8 3 より高いことを確認した。

50

【0127】

実施例2-3. P U A Fタンパク質に対する親和度の確認

前記実施例2-1で製造したc P M A b 2 2またはc P M A b 2 0 5のP U A Fタンパク質に対する親和度を確認するために、次のような方法を行った。

【0128】

具体的には、間接E L I S Aを行った。免疫プレートにP A U F - H i sをコーティングした後、各抗体を濃度別に処理し、二次抗体としては、ヒトの不変領域を認識する抗ヒトF c - H R Pを使用して分析した。そのとき、各抗体の濃度が増加するにつれてO D値は増加することになる。

【0129】

その結果、図4で見られるように、c P M A b 2 2またはc P M A b 2 0 5はP U A Fタンパク質に対して非常に高い親和力を有しており、特に、既存の抗P A U Fヒト抗体であるP M A b 8 3より高いことを確認した。

【0130】

実施例2-4. 癌細胞の増殖 (proliferation) 抑制効果の確認

前記実施例2-1で製造したキメラ抗体c P M A b 2 2の癌に対する治療効果を確認するために、膵臓癌細胞株B x P C - 3に対する増殖抑制効果を確認した。

【0131】

具体的には、W S T - 1増殖アッセイ (proliferation assay)を行った。P A U Fの独自の発現量が高いB x P C - 3細胞株を96ウェルプレートに3 x 10³ずつ入れた後、I g Gとキメラ抗体c P M A b 2 2とヒト抗体P M A b 8 3を15 μ g / m lずつ2日に一回処理した。その後、W S T - 1を処理して450nmで吸光度を測定した。

【0132】

その結果、図5で見られるように、I g G対照群の抗体を処理したグループに比べて、c P M A b 2 2を処理したグループがB x P C - 3細胞の増殖抑制能がより良いことを確認した。

【0133】

前記結果を通じてc P M A b 2 2は、優れた癌細胞増殖抑制効果を示したため、癌の予防または治療物質として有用に使用されるものであることが分かった。

【0134】

実施例2-5. 癌細胞の移動 (migration) 抑制効果の確認

前記実施例2-1で製造したキメラ抗体c P M A b 2 2の癌に対する治療効果を確認するために、膵臓癌細胞株C F P A C - 1及び膵臓癌の患者に由来する膵臓癌細胞A M C P A C 0 4の移動抑制効果を確認した。

【0135】

具体的には、トランスウェル (Transwell) を利用した移動アッセイ (migration assay) を行った。膵臓癌細胞株C F P A C - 1の場合、トランスウェルの上部区画 (upper compartment) には血清が含まれていない培地を用いて、各細胞を5 x 10⁴ずつ入れ、I g Gとc P M A b 2 2及びP M A b 8 3を15 μ g / m lで処理した。下部区画 (Lower compartment) には、血清を含む培地を入れた、24時間後、各細胞の移動を観察した。また、膵臓癌患者に由来する膵臓癌細胞A M C P A C 0 4は上部区画には血清が含まれていない培地を用いて、各細胞を6 x 10⁴ずつ入れ、I g Gとc P M A b 2 2及びP M A b 8 3を10 μ g / m lで処理した。下部区画には、血清を含む培地を入れ、20時間後、細胞の移動を観察した。

【0136】

その結果、図6で見られるように、I g G対照群の抗体を処理したグループに比べて、c P M A b 2 2を処理したグループは、膵臓癌細胞株または患者由来の膵臓癌の移動程度が著しく減少することを確認した。特に、これはP M A b 8 3を処理したグループに比べても、より低いことを確認した。

【0137】

10

20

30

40

50

前記結果を通じて c P M A b 2 2 は、既存の抗 P A U F ヒト抗体である P M A b 8 3 より優れた癌細胞の移動抑制効果を示したため、癌の予防または治療物質として有用に使用されるものであることが分かった。

【 0 1 3 8 】

実施例 2 - 6 . 癌細胞の浸潤 (invasion) 抑制効果の確認

前記実施例 2 - 1 で製造したキメラ抗体 c P M A b 2 2 の癌に対する治療効果を確認するために、膵臓癌細胞株 C F P A C - 1 及び膵臓癌患者に由来する膵臓癌細胞である A M C P A C 0 4 に対する浸潤抑制効果を確認した。

【 0 1 3 9 】

具体的には、トランスウェルを用いた浸潤アッセイ (invasion assay) を行った。そのとき、トランスウェルに細胞外基質を人為的に模写するマトリゲル (matrigel) をコーティングし、各抗体により変化する膵臓癌細胞株の浸潤能を観察した。膵臓癌細胞株 C F P A C - 1 の場合、トランスウェルの上部区画には血清が含まれていない培地を用いて、各細胞を 7×10^4 ずつ入れ、I g G と c P M A b 2 2 及び P M A b 8 3 を $15 \mu\text{g} / \text{ml}$ で処理した。下部区画には、血清を含む培地を入れ、24 時間後、各細胞の浸潤を観察した。また、膵臓癌患者に由来する膵臓癌細胞 A M C P A C 0 4 は上部区画に血清が含まれていない培地を用いて、各細胞を 6×10^4 ずつ入れ、I g G と c P M A b 2 2 及び P M A b 8 3 を $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ で処理した。下部区画には、血清が含まれた培地を入れ、20 時間後に細胞の浸潤を観察した。

10

【 0 1 4 0 】

その結果、図 7 で見られるように、I g G 対照群の抗体を処理したグループに比べて、c P M A b 2 2 を処理したグループは、膵臓癌細胞株または患者由来膵臓癌の浸潤程度が著しく減少することを確認した。特に、これは P M A b 8 3 を処理したグループに比べても、より低いことを確認した。

20

【 0 1 4 1 】

前記結果を通じて c P M A b 2 2 は、既存の抗 P A U F ヒト抗体である P M A b 8 3 より優れた癌細胞浸潤抑制効果を示したため、癌の予防または治療物質として有用に使用されるものであることが分かった。

【 0 1 4 2 】

実施例 3 . 抗 P A U F タンパク質ヒト化抗体 (humanized antibodies) の製造及び特性の確認

30

実施例 3 - 1 . h P M A b 2 2 の製造

前記実施例 1 で発掘した 2 H 2 マウス抗体及び前記実施例 2 で製造した c P M A b 2 2 キメラ抗体の拒否反応を最小限に抑えるために、2 H 2 及び c P M A b 2 2 の C D R (マウス由来) は維持し、C D R を除いた可変領域及び不変領域はヒト由来のタンパク質に変えたヒト化抗体を製造した。

【 0 1 4 3 】

具体的には、C D R g r a f t i n g を通じて 2 H 2 - V H 1 / V L 1、2 H 2 - V H 1 / V L 2、2 H 2 - V H 1 / V L 3 の 3 種のヒト化抗体を製造し、これらの親和度及び生産収率を確認した。ヒト化抗体の発現量を測定するために、それぞれ 5 m l のレベルで 3 つの重鎖 V H 1、V H 2、V H 3 と 3 つの軽鎖 V L 1、V L 2、V L 3 を互いに交差組立 (cross assembling) させて H E K 2 9 3 細胞に形質注入した。その後、6 日後に抗体のタンパク質が含まれた培地を収穫して培養液を得、ウェスタンブロットを通じて発現率を測定した。また、これら抗体の親和度の分析のために、間接 E L I S A を行った。免疫プレートに P A U F - H i s をコーティングした後、各抗体を濃度別処理し、二次抗体としては、ヒト抗体の不変領域を認識する抗ヒト F c - H R P を使用して O D 値を測定した。

40

【 0 1 4 4 】

その結果、図 8 で見られるように、他のヒト化抗体に比べて、2 H 2 - V H 1 / V L 1 抗体が P U A F タンパク質に対して最も高い親和度を有しており、これはキメラ抗体である

50

c P M A b 2 2、または既存の抗 P A U F ヒト抗体である P M A b 8 3 よりも高いことを確認した。

【 0 1 4 5 】

併せて、図 9 で見られるように、2 H 2 - V H 1 / V L 1 抗体の生産収率は 1 6 5 . 5 m g / L であり、2 8 . 2 5 m g / L または 4 2 . 0 m g / L の収率を有する 2 H 2 - V H 1 / V L 2 または 2 H 2 - V H 1 / V L 3 よりも非常に高いことを確認した。

【 0 1 4 6 】

前記結果を通じて P U A F タンパク質に対して最も高い親和度を有し、最も高い収率を有する前記 2 H 2 - V H 1 / V L 1 抗体を、本発明に係る 2 H 2 及び c P M A b 2 2 のヒト化抗体として選別して「h P M A b 2 2」と命名し、その配列は下記表 3 に記載した。

10

【 0 1 4 7 】

【表 3】

抗 P A U F タンパク質ヒト化抗体、「h P M A b 2 2」のアミノ酸配列

抗体名	区分	配列	配列番号
hPMAb22	重鎖可変領域 (Heavy chain variable region;V _H)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHWRQAP GQGLEWMGWIDPENGNTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYME LSRLRSDDTAVYYCARRAITTATAWFAYWGQGLTVSS	28
	V _H -CDR1	GFNIKDY	1
	V _H -CDR2	IDPENGNT	2
	V _H -CDR3	ARRAITTATAWFA	3
	V _H -CDR3	ARRAITTATAWFAY	4
	V _H -FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	19
	V _H -FR2	MHWRQAPGQGLEWMGW	20
	V _H -FR3	NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELLSRLRSDDTAVYYC	21
	V _H -FR4	YWGQGLTVSS	22
	V _H -FR4	WGQGLTVSS	23
	軽鎖可変領域 (Light chain variable region;V _L)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSRTRKNYLAW YQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCKQSYNLYTFGQGTKVEIK	29
	V _L -CDR1	QSLNSRTRKNY	5
	V _L -CDR2	WAS	6
	V _L -CDR3	KQSYNLY	7
	V _L -FR1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS	24
	V _L -FR2	LAWYQQKPGQPPKLLIY	25
	V _L -FR3	TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLSLQAEDVAVYYC	26
	V _L -FR4	TFGQGTKVEIK	27

20

30

40

【 0 1 4 8 】

実施例 3 - 2 . P U A F タンパク質に対する特異度の確認

前記実施例 3 - 1 で製造したヒト化抗体 h P M A b 2 2 の P U A F タンパク質に対する特異度を確認するために、前記実施例 2 - 2 による方法を行った。

【 0 1 4 9 】

その結果、図 1 0 で見られるように、h P M A b 2 2 は P U A F タンパク質に対して非常に高い特異度を有しており、特に、既存の抗 P A U F ヒト抗体である P M A b 8 3 より高

50

いことを確認した。

【0150】

実施例3-3. P U A Fタンパク質に対する親和度の確認

前記実施例3-1で製造したヒト化抗体h P M A b 2 2のP U A Fタンパク質に対する親和度を確認するために、次のような方法を行った。

【0151】

具体的には、S P R方法を用いて抗原抗体の結合力を測定した。金属薄膜の表面に抗原P A U Fを固定させた後、抗体を濃度別に希釈して金属表面を通るようにした。抗原と抗体が結合する時間と解離する時間を測定し、各抗原抗体の結合親和性を測定した。

【0152】

その結果、図11で見られるように、P A M b 8 3の場合、 1.169×10^{-9} M、h P M A b 2 2は 0.1938×10^{-9} MのK d値を示すことを確認した。前記結果を通じてh P M A b 2 2はP U A Fタンパク質に対して非常に高い親和度を有しており、特に、既存の抗P A U Fヒト抗体であるP M A b 8 3より高いことが分かった。

【0153】

実施例3-4. エピトープの確認

前記実施例3-1で製造したh P M A b 2 2のエピトープを確認するために、まず既存の抗P A U Fヒト抗体であるP M A b 8 3とエピトープが同一かを前記実施例1~3に基づいて確認した。

【0154】

その結果、図12で見られるように、h P M A b 2 2はP M A b 8 3と異なるエピトープを有することを確認した。

【0155】

実施例3-5. 癌細胞の増殖抑制効果の確認

前記実施例3-1で製造したヒト化抗体h P M A b 2 2の癌に対する治療効果を確認するために、膵臓癌細胞株C F P A C - 1に対する増殖抑制効果を、前記実施例2-4に係る方法で確認した。

【0156】

その結果、図13で見られるように、I g G対照群の抗体を処理したグループに比べて、h P M A b 2 2を処理したグループがC F P A C - 1細胞の増殖抑制能がより良いことを確認した。

【0157】

前記結果を通じてh P M A b 2 2は、優れた癌細胞増殖抑制効果を示したため、癌の予防または治療物質として有用に使用されるものであることが分かった。

【0158】

実施例3-6. 癌細胞の移動抑制効果の確認

前記実施例3-1で製造したヒト化抗体h P M A b 2 2の癌に対する治療効果を確認するために、膵臓癌患者に由来する膵臓癌細胞A M C P A C 0 6及び卵巣癌細胞株O V C A R - 5に対する移動抑制効果を、前記実施例2-5による方法で確認した。

【0159】

その結果、図14で見られるように、I g G対照群の抗体を処理したグループに比べて、h P M A b 2 2を処理したグループは、膵臓癌細胞株、患者由来の膵臓癌、または卵巣癌細胞株の移動度が著しく減少することを確認した。特に、これはP M A b 8 3を処理したグループに比べても、より低いことを確認した。

【0160】

前記結果を通じてh P M A b 2 2は、既存の抗P A U Fヒト抗体であるP M A b 8 3より優れた癌細胞の移動抑制効果を示したため、癌の予防または治療物質として有用に使用されるものであることが分かった。

【0161】

実施例3-7. 癌細胞の浸潤抑制効果の確認

10

20

30

40

50

前記実施例 3 - 1 で製造したヒト化抗体 h P M A b 2 2 の癌に対する治療効果を確認するために、膵臓癌患者に由来する膵臓癌細胞 A M C P A C 0 4 または A M C P A C 0 6 及び卵巣癌細胞株 O V C A R - 5 に対する浸潤抑制効果を、実施例 2 - 6 による方法で確認した。

【 0 1 6 2 】

その結果、図 1 5 で見られるように、I g G 対照群の抗体を処理したグループに比べて、h P M A b 2 2 を処理したグループは、膵臓癌細胞株、患者由来の膵臓癌、または卵巣癌細胞株の浸潤程度が著しく減少することを確認した。特に、これは P M A b 8 3 を処理したグループに比べても、より低いことを確認した。

【 0 1 6 3 】

前記結果を通じて h P M A b 2 2 は、既存の抗 P A U F ヒト抗体である P M A b 8 3 より優れた癌細胞浸潤抑制効果を示すため、これは癌の予防または治療物質として有用に使用されるものであることが分かった。

【 0 1 6 4 】

実施例 3 - 8 . 生体内 (in vivo) 抗癌効果の確認

前記実施例 3 - 5 ~ 3 - 7 を通じて P A U F タンパク質に特異的なヒト化抗体 h P M A b 2 2 は試験管内 (in vitro) で癌細胞の増殖、移動及び浸潤を抑制することを確認することにより、生体内 (in vivo) でも同一な抗癌効果を示すかを確認した。

【 0 1 6 5 】

具体的には、膵管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma) 患者の癌組織を N S G マウスに移植して P D X (patient-derived xenograft) マウスモデルを作製した。P D X マウスモデルから摘出した癌組織をヌードマウスの右脚皮下に移植し、約 3 週間後に、腫瘍の大きさが 8 0 ~ 1 2 0 m m ³ に形成されたマウスを選別してグループを分けた。薬物投与は尾静脈にし、I g G 及び h P M A b 2 2 は 1 0 m g / k g で、1 週に 2 回ずつ、合計 4 週間投与し、陽性対照群であるジェムザール (Gemzar; Gemcitabine) は 5 0 m g / k g で一回投与した。そのとき、1 週に 2 回ずつキャリパーを使用して腫瘍のサイズを測定し、マウスの体重も測定して腫瘍の薬物に対する反応性を確認した。3 1 日目で実験を終了し、腫瘍を摘出した後、各腫瘍の重量を測定して比較した。

【 0 1 6 6 】

その結果、図 1 6 で見られるように、対照群の抗体を投与したグループに比べて、h P M A b 2 2 を投与したグループは、癌細胞の成長が 3 0 % 以上減少することを確認した。特に、前記成長抑制効果は抗癌剤として使用されているジェムザールを投与したグループよりも優れていることを確認した。

【 0 1 6 7 】

前記結果を通じて h P M A b 2 2 は既存の抗癌剤であるジェムザールより優れた生体内癌の成長抑制効果を示すため、これは癌の予防または治療物質として有用に使用されるものであることが分かった。

【 0 1 6 8 】

以上の説明から、本発明が属する技術分野の当業者であれば、本発明がその技術的思想や必須の特徴を変更することなく、他の具体的な形態で実施できることを理解できるだろう。これに関連し、以上で記述した実施例はあくまで例示的なものであり、限定的なものではないことを理解すべきである。本発明の範囲は前記詳細な説明よりは、後述する特許請求の範囲の意味及び範囲、そしてその等価概念から導かれるあらゆる変更または変形された形態が本発明の範囲に含まれるものと解釈すべきである。

10

20

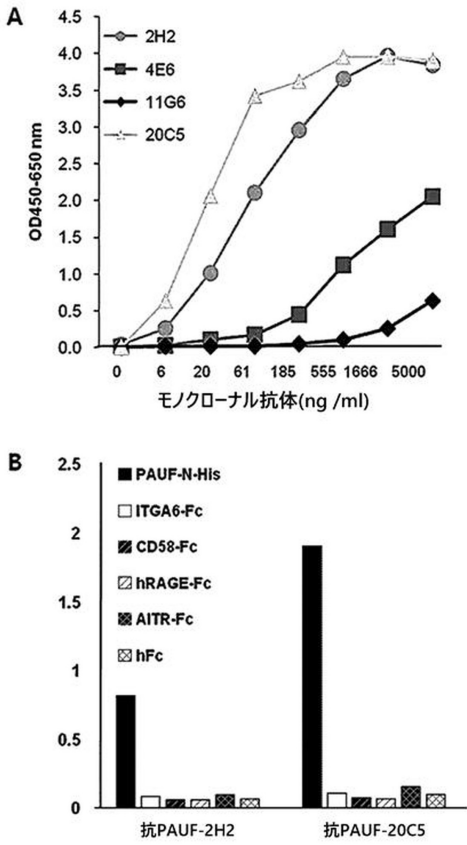
30

40

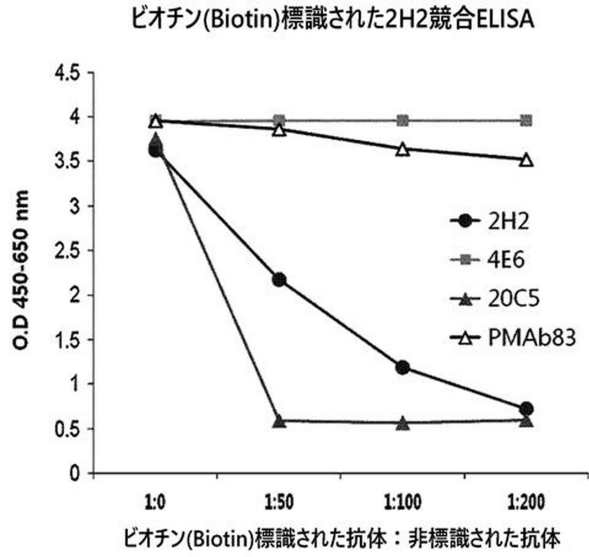
50

【 図面 】

【 図 1 】



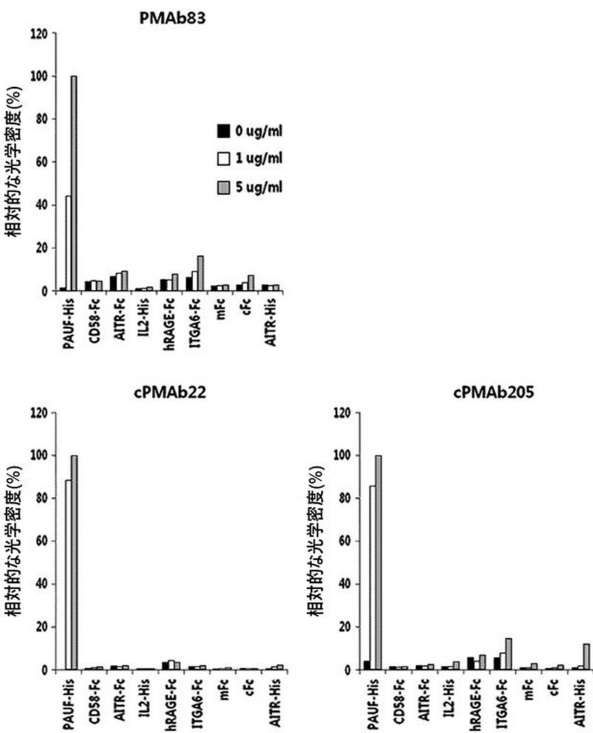
【 図 2 】



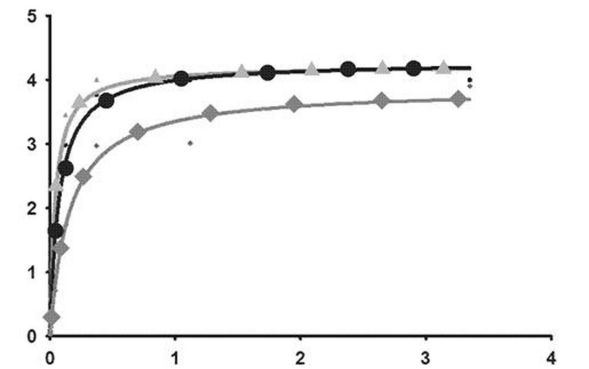
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】



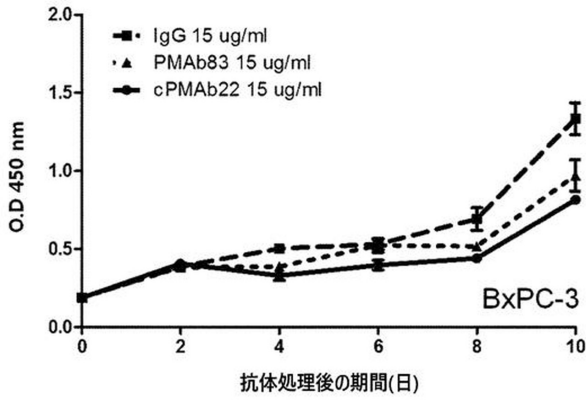
30

凡例	抗体	K_d (10^{-9} M)
▲	cPMAb22	0.01
●	cPMAb205	0.03
◆	PMAb83	0.18

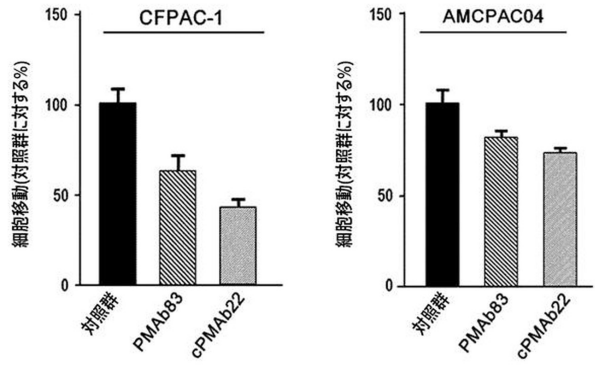
40

50

【 図 5 】

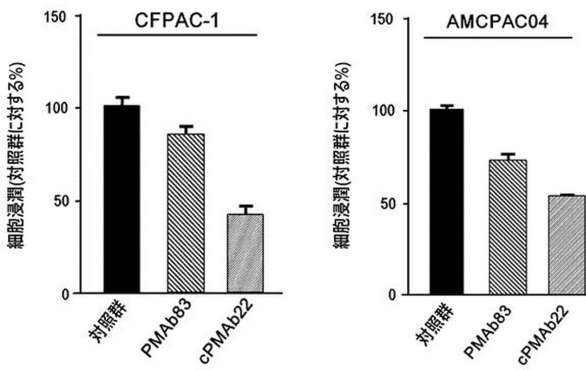


【 図 6 】

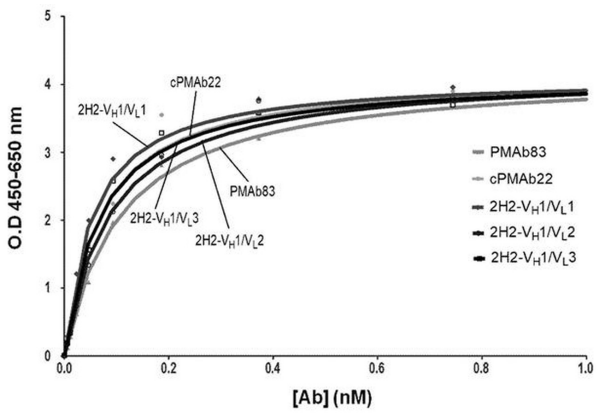


10

【 図 7 】



【 図 8 】



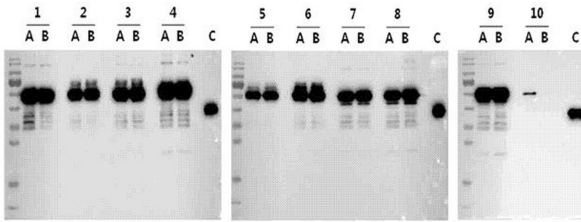
20

30

40

50

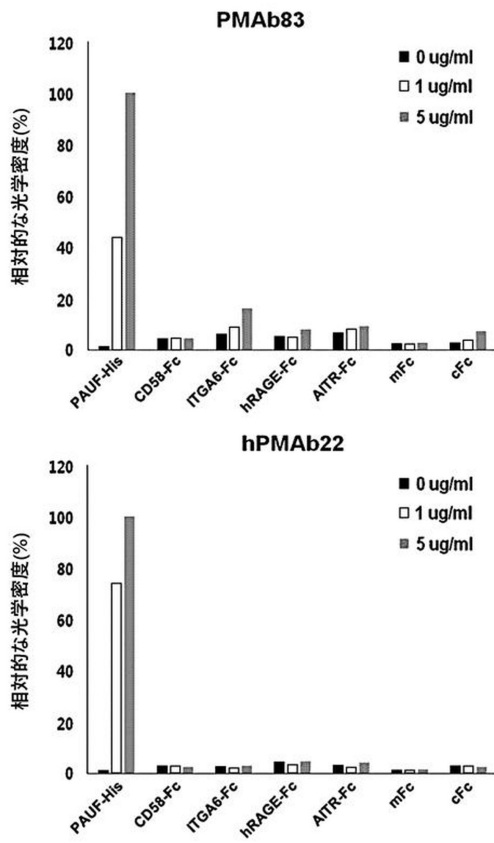
【 図 9 】



▶ 収率

- 1: 2H2-V_H1-V_L1: 165.5 mg/L
- 2: 2H2-V_H1-V_L2: 28.25 mg/L
- 3: 2H2-V_H1-V_L3: 42.0 mg/L

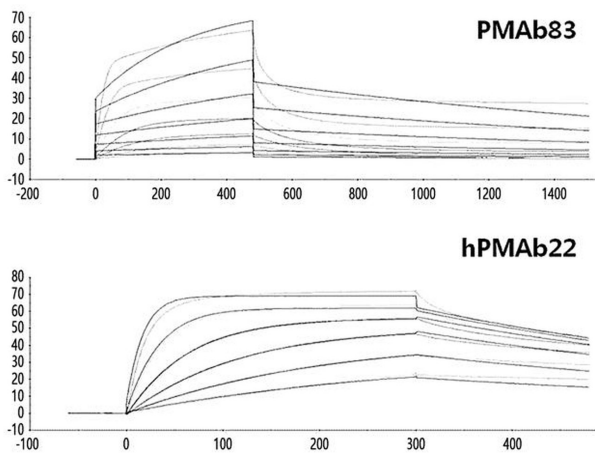
【 図 10 】



10

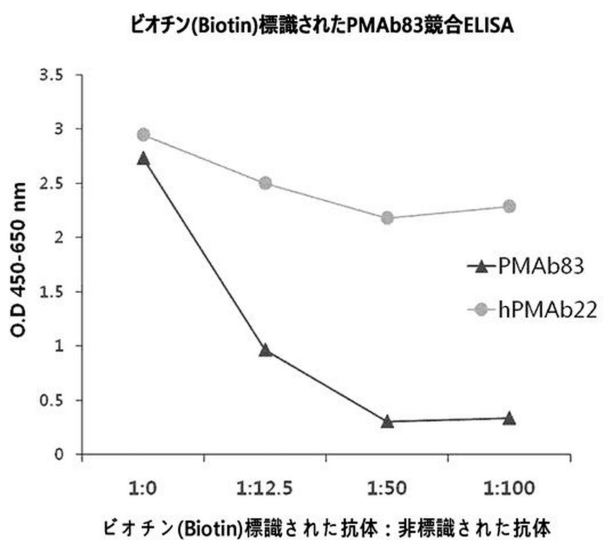
20

【 図 11 】



抗体	K_d (10^{-9} M)
PMAb83	1.169
hPMAb22	0.1938

【 図 12 】

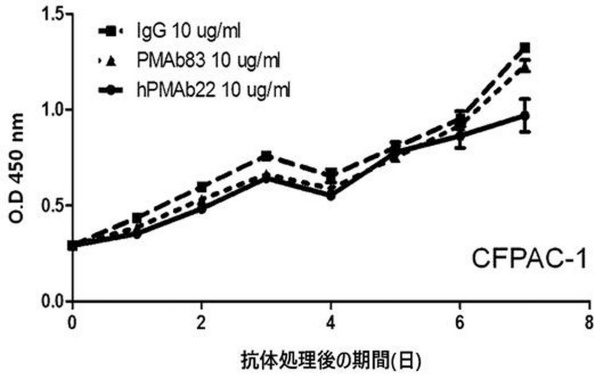


30

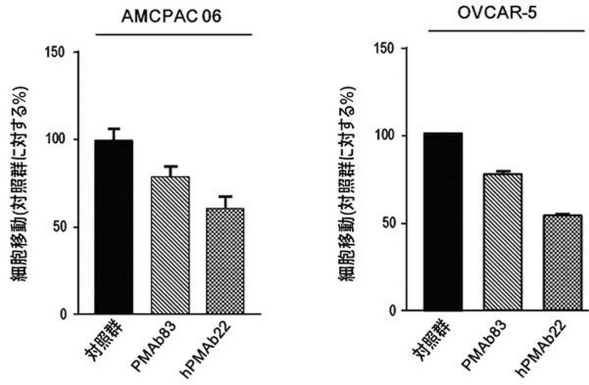
40

50

【図 1 3】

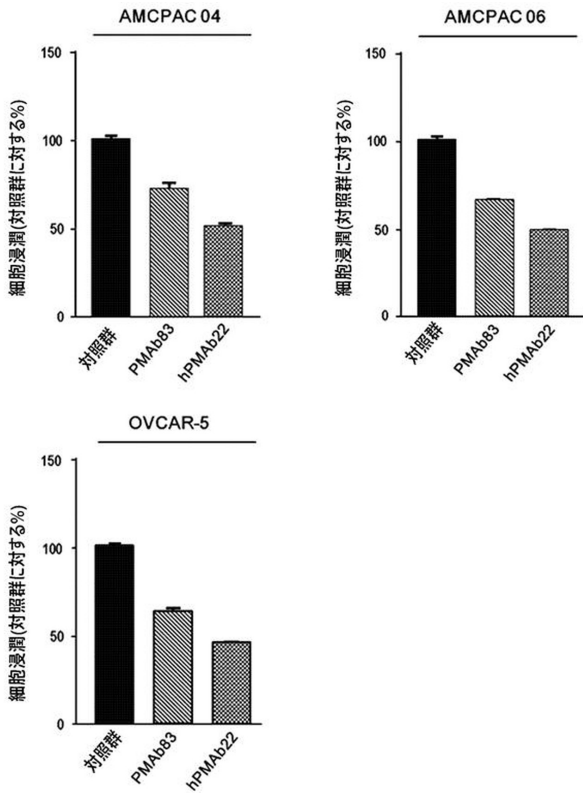


【図 1 4】

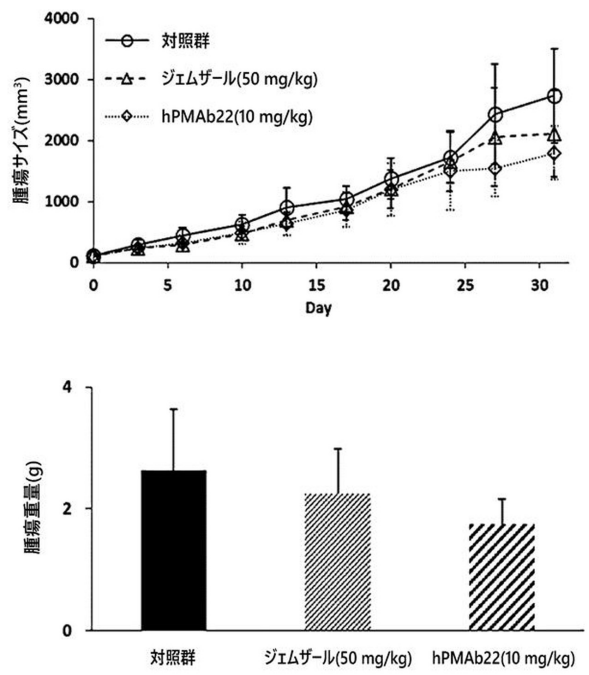


10

【図 1 5】



【図 1 6】



20

30

【配列表】

0007017581000001.app

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/02 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 A 6 1 P 35/04 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 47/68 (2017.01)
 G 0 1 N 33/574 (2006.01)
 G 0 1 N 33/53 (2006.01)
 G 0 1 N 33/50 (2006.01)
 G 0 1 N 33/15 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)

F I

C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 Q 1/02
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 43/00 1 1 1
 A 6 1 P 35/04
 A 6 1 K 39/395 E
 A 6 1 K 39/395 T
 A 6 1 K 39/395 L
 A 6 1 K 39/395 C
 A 6 1 K 47/68
 G 0 1 N 33/574 A
 G 0 1 N 33/53 D
 G 0 1 N 33/50 Z
 G 0 1 N 33/15 Z
 C 1 2 P 21/08

ール, シンガポール サイエンス パーク, アセントタワー ビー 04番 - 13 / 14, サイエ
 ンス パーク ドライブ 2

(74)代理人 100113376

弁理士 南条 雅裕

(74)代理人 100179394

弁理士 瀬田 あや子

(74)代理人 100185384

弁理士 伊波 興一朗

(74)代理人 100137811

弁理士 原 秀貢人

(72)発明者 コ サンソク

大韓民国 4 6 7 6 5 プサン, カンソク, ミョンジ オーシャン シティ 11 口, 22, 1
 03 - 1301

(72)発明者 キム ヨンジョン

大韓民国 4 6 6 2 3 プサン, ブック, モブンヘ口, 132 ボンギル, 16

(72)発明者 ヨン ソウン

大韓民国 3 9 2 1 5 キョンサンブクト, グミシ, ソンドン口 2 - ギル, 32, 205 - 406

(72)発明者 キム ソンチョル

大韓民国 0 5 5 0 7 ソウル, ソンパク, オリピック口, 435, 221 - 2002

(72)発明者 ホン ソンモ

大韓民国 0 6 2 1 7 ソウル, カンナムク, ヨクサム口, 314, 304 - 601

(72)発明者 ジョン ソンユン

大韓民国 1 6 8 4 5 キョンギド, ヨンインシ, スジク, シンボン1口, 11, 510 - 801

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 韓国登録特許第10 - 1098186 (KR, B1)

国際公開第2007 / 145466 (WO, A1)

Cancer Sci., 2009年, Vol.100, p.828-836

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 15 / 13

C 0 7 K 16 / 30

C 1 2 N 15 / 63

C 1 2 N 1 / 15

C 1 2 N 1 / 19

C 1 2 N 1 / 21

C 1 2 N 5 / 1 0

C 1 2 Q 1 / 0 2

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 P 4 3 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 4

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

A 6 1 K 4 7 / 6 8

G 0 1 N 3 3 / 5 7 4

G 0 1 N 3 3 / 5 3

G 0 1 N 3 3 / 5 0

G 0 1 N 3 3 / 1 5

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)