

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6947435号
(P6947435)

(45) 発行日 令和3年10月13日 (2021. 10. 13)

(24) 登録日 令和3年9月21日 (2021. 9. 21)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 15/13 (2006. 01)	C 1 2 N 15/13	
C O 7 K 16/30 (2006. 01)	C O 7 K 16/30	Z N A
C O 7 K 16/46 (2006. 01)	C O 7 K 16/46	
C O 7 K 19/00 (2006. 01)	C O 7 K 19/00	
C 1 2 N 15/63 (2006. 01)	C 1 2 N 15/63	Z
請求項の数 30 (全 59 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-525786 (P2019-525786)	(73) 特許権者	518126410
(86) (22) 出願日	平成29年11月14日 (2017. 11. 14)		アプロゲン・メディシズ・インコーポレ イテッド
(65) 公表番号	特表2020-511111 (P2020-511111A)		Aprogen Medicines I nc.
(43) 公表日	令和2年4月16日 (2020. 4. 16)		大韓民国、13215 キョンギード、ソ ンナムーシ、チュンウォング、ダンチョ ンデロ 545、ビー2エフ
(86) 国際出願番号	PCT/KR2017/012892		
(87) 国際公開番号	W02018/088878	(74) 代理人	110001508
(87) 国際公開日	平成30年5月17日 (2018. 5. 17)		特許業務法人 津国
審査請求日	令和1年5月20日 (2019. 5. 20)	(72) 発明者	ムン, ユリ
(31) 優先権主張番号	10-2016-0151382		大韓民国、05304 ソウル、カンドン ーク、チョンチュンロ・49ガーギル 56、ナンバー201-519
(32) 優先日	平成28年11月14日 (2016. 11. 14)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)		最終頁に続く
微生物の受託番号	KCLRF KCLRF-BP-00279		
微生物の受託番号	KCLRF KCLRF-BP-00280		

(54) 【発明の名称】 炭酸脱水素酵素に結合する抗体およびその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記 (1) ~ (11) :

(1) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む V H - C D R 1 ; 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む V H - C D R 2 ; 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む V H - C D R 3 ; 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む V L - C D R 1 ; 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む V L - C D R 2 ; および配列番号 11 のアミノ酸配列を含む V L - C D R 3 ;

(2) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む V H - C D R 1 ; 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む V H - C D R 2 ; 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む V H - C D R 3 ; 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む V L - C D R 1 ; 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む V L - C D R 2 ; および配列番号 19 のアミノ酸配列を含む V L - C D R 3 ;

(3) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む V H - C D R 1 ; 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む V H - C D R 2 ; 配列番号 28 のアミノ酸配列を含む V H - C D R 3 ; 配列番号 32 のアミノ酸配列を含む V L - C D R 1 ; 配列番号 34 のアミノ酸配列を含む V L - C D R 2 ; および配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V L - C D R 3 ;

(4) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む V H - C D R 1 ; 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む V H - C D R 2 ; 配列番号 28 のアミノ酸配列を含む V H - C D R 3 ; 配列番号 33 のアミノ酸配列を含む V L - C D R 1 ; 配列番号 35 のアミノ酸配列を含む V L - C D R 2 ; および配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V L - C D R 3 ;

(5) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む V H - C D R 1 ; 配列番号 15 のアミノ酸配列

10

20

を含むVH-CDR2；配列番号28のアミノ酸配列を含むVH-CDR3；配列番号33のアミノ酸配列を含むVL-CDR1；配列番号36のアミノ酸配列を含むVL-CDR2；および配列番号31のアミノ酸配列を含むVL-CDR3；

(6) 配列番号14のアミノ酸配列を含むVH-CDR1；配列番号15のアミノ酸配列を含むVH-CDR2；配列番号28のアミノ酸配列を含むVH-CDR3；配列番号33のアミノ酸配列を含むVL-CDR1；配列番号37のアミノ酸配列を含むVL-CDR2；および配列番号31のアミノ酸配列を含むVL-CDR3；

(7) 配列番号14のアミノ酸配列を含むVH-CDR1；配列番号15のアミノ酸配列を含むVH-CDR2；配列番号28のアミノ酸配列を含むVH-CDR3；配列番号33のアミノ酸配列を含むVL-CDR1；配列番号38のアミノ酸配列を含むVL-CDR2；および配列番号31のアミノ酸配列を含むVL-CDR3；

10

(8) 配列番号14のアミノ酸配列を含むVH-CDR1；配列番号15のアミノ酸配列を含むVH-CDR2；配列番号28のアミノ酸配列を含むVH-CDR3；配列番号33のアミノ酸配列を含むVL-CDR1；配列番号39のアミノ酸配列を含むVL-CDR2；および配列番号31のアミノ酸配列を含むVL-CDR3；

(9) 配列番号14のアミノ酸配列を含むVH-CDR1；配列番号15のアミノ酸配列を含むVH-CDR2；配列番号28のアミノ酸配列を含むVH-CDR3；配列番号33のアミノ酸配列を含むVL-CDR1；配列番号40のアミノ酸配列を含むVL-CDR2；および配列番号31のアミノ酸配列を含むVL-CDR3；

(10) 配列番号14のアミノ酸配列を含むVH-CDR1；配列番号15のアミノ酸配列を含むVH-CDR2；配列番号28のアミノ酸配列を含むVH-CDR3；配列番号33のアミノ酸配列を含むVL-CDR1；配列番号41のアミノ酸配列を含むVL-CDR2；および配列番号31のアミノ酸配列を含むVL-CDR3；および

20

(11) 配列番号14のアミノ酸配列を含むVH-CDR1；配列番号15のアミノ酸配列を含むVH-CDR2；配列番号28のアミノ酸配列を含むVH-CDR3；配列番号32のアミノ酸配列を含むVL-CDR1；配列番号42のアミノ酸配列を含むVL-CDR2；および配列番号31のアミノ酸配列を含むVL-CDR3

のいずれか1つのCDRの組合わせを含み、炭酸脱水素化酵素XII（カーボニックアンヒドラーゼ XII、CA XII）に結合し、

配列番号1のアミノ酸配列を含むペプチド断片、または配列番号3のアミノ酸配列を含むペプチド断片に結合する、抗-CA XII抗体またはその抗原結合断片。

30

【請求項2】

前記抗体は、配列番号43～46のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のフレームワークを追加的に含むものである、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項3】

前記抗体は、配列番号47、48、51および52のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のフレームワークを追加的に含むものである、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項4】

配列番号48のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のフレームワークは、配列番号49または50のアミノ酸配列を含む、請求項3に記載の抗体またはその抗原結合断片。

40

【請求項5】

前記抗体は、配列番号53のV_H領域のアミノ酸配列および配列番号54～63からなる群より選択されたV_L領域のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項6】

寄託番号KCLRF-BP-00279またはKCLRF-BP-00280を有するハイブリドーマから生産された抗CA-XII抗体のCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む抗CA-XII抗体またはその抗原結合断片。

50

【請求項 7】

寄託番号 K C L R F - B P - 0 0 2 7 9 または K C L R F - B P - 0 0 2 8 0 を有するハイブリドーマから生産された抗 C A - X I I 抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、請求項 6 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 8】

前記抗 C A - X I I 抗体は、動物抗体、キメラ抗体、またはヒト化抗体である、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗 C A - X I I 抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 9】

C A - X I I に対して作用剤（アゴニスト）の活性を有するものである、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項 10】

前記抗原結合断片は、前記抗 C A - X I I 抗体の s c F v、(s c F v)₂、F a b、F a b' または F (a b')₂ である、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の抗 - C D 6 6 c 抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 11】

前記抗体またはその抗原結合断片は、標識基、毒性物質または抗癌剤が追加的に結合したものである、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 12】

前記標識基は、放射線同位元素、ハプテン、蛍光物質、クロモゲンおよび染色物質からなる群より選択されたものである、請求項 11 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

20

【請求項 13】

前記毒性物質は、放射線同位元素、小分子、ペプチド、またはタンパク質である、請求項 11 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 14】

前記抗体または抗原結合断片は、毒性物質と結合して融合タンパク質を形成するものである、請求項 11 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 15】

前記抗体または抗原結合断片は、抗体に結合したフコースの一部または全部が除去されたものである、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 16】

30

請求項 1 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の炭酸脱水素化酵素 (c a r b o n i c a n h y d r a s e) に結合する抗体またはその抗原結合断片をコーディングする核酸分子。

【請求項 17】

請求項 1 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片をコーディングする核酸分子が導入されたベクター。

【請求項 18】

請求項 1 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の炭酸脱水素化酵素 (c a r b o n i c a n h y d r a s e) に結合する抗体またはその抗原結合断片を発現する宿主。

【請求項 19】

前記宿主は、ハイブリドーマ細胞である、請求項 18 に記載の宿主。

40

【請求項 20】

前記宿主は、炭酸脱水素化酵素 (c a r b o n i c a n h y d r a s e) に結合する抗体またはその抗原結合断片を生産し、受託番号 K C L R F - B P - 0 0 2 8 0 または K C L R F - B P - 0 0 2 7 9 を有するハイブリドーマ細胞である、請求項 18 に記載の宿主。

【請求項 21】

請求項 1 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の炭酸脱水素化酵素 (c a r b o n i c a n h y d r a s e) に結合する抗体またはその抗原結合断片を含む、固形癌の予防、軽減または治療用薬学組成物。

【請求項 22】

50

前記固形癌は、乳癌、肺癌、大腸癌、胃癌、前立腺癌又は肝癌である、請求項 2 1 に記載の薬学組成物。

【請求項 2 3】

乳癌は、三重陰性乳癌である、請求項 2 2 に記載の薬学組成物。

【請求項 2 4】

前記抗体またはその抗原結合断片は、毒性物質が追加的に結合したものである、請求項 2 1 に記載の薬学組成物。

【請求項 2 5】

化学的抗癌剤または異なる抗体抗癌剤が追加的に含まれるものである、請求項 2 4 に記載の薬学組成物。

【請求項 2 6】

前記薬学組成物の投与は、放射線抗癌方法と共に行われるものである、請求項 2 5 に記載の薬学組成物。

【請求項 2 7】

請求項 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の炭酸脱水素化酵素 (carbonic anhydrase) に結合する抗体またはその抗原結合断片を含み、対象試料と前記抗体または抗原結合断片の陽性反応を示す試料を固形癌として探知する固形癌の検出用組成物。

【請求項 2 8】

前記抗体またはその抗原結合断片は、標識基が結合したものである、請求項 2 7 に記載の固形癌の検出用組成物。

【請求項 2 9】

前記固形癌は、乳癌、肺癌、大腸癌、胃癌、前立腺癌、肝癌である、請求項 2 7 に記載の固形癌の検出用組成物。

【請求項 3 0】

前記陽性反応は、酵素反応、蛍光、発光または放射線を検出して判断するものである、請求項 2 7 に記載の固形癌の検出用組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、炭酸脱水素酵素を認識し結合する抗体、前記抗体または抗原結合断片をコーディングする核酸分子、前記核酸分子を含むベクターおよび宿主細胞および前記抗体または抗原結合断片の炭酸脱水素酵素関連疾病、例えば、固形癌の軽減、予防、治療または診断用途に関する。

【背景技術】

【0002】

炭酸脱水素酵素 (Carbonic anhydrase、CA) は、炭酸水素塩およびプロトンへの炭酸の可逆的水和を触媒して、このように生体内の pH 恒常性の維持に関与する酵素ファミリーに属する酵素である。大部分の炭酸脱水素酵素は活性部位に亜鉛イオンを含有するため、これらは金属酵素と分類される。

【0003】

炭酸脱水素酵素のファミリーは、いくつかのグループに区分され、少なくとも 5 の特異的な CA サブファミリーがある (α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ)。 α -炭酸脱水素酵素 (CA) は、哺乳動物において見られる。 α -CA 酵素は、4 個の広い小グループ、つまり、細胞質基質 CA (CA-I、CA-II、CA-III、CA-VI および CA-XII)、ミトコンドリア CA (CA-VA および CA-VB)、分泌 CA (CA-VI) および膜結合型 CA (CA-IV、CA-IX、CA-XI、CA-XIV および CA-XV) に分類される。

【0004】

CA-II、CA-IX および CA-XI は腫瘍に関連付けられていて、これらは、多様な腫瘍に対する潜在的な組織学的かつ予後的なバイオマーカーである [Nordfo

10

20

30

40

50

rs et al. (2010)、BMC cancer; 10:148]。CA-I Iは、最も広範囲に発現している、 α -CA遺伝子ファミリーのメンバーであり、ヒトの組織および臓器においても実質的に存在する。膜貫通酵素のCA-I Xは、様々な種類のヒトの癌腫瘍および正常胃腸組織において発現する腫瘍関連抗原として認知された。CA-I Xは、細胞接着、分化、増殖および発癌プロセスに機能的に関連付けられていて、その酵素活性はCA-I Iに匹敵する。他の膜貫通CAアイソザイムのCA-X I Iは、正常腎臓組織および腎臓細胞癌腫瘍において最初に発見された。しかし、新たな研究によって、CA-X I Iは、その他のいくつかの腫瘍 [Ulmasov, B., (2000). Purification and kinetic analysis of recombinant CA X I I, a membrane carbonic anhyd 10
rase overexpressed in certain cancers. Proc Natl Acad Sci USA 97, 14212-14217] において、結腸および子宮などのいくつかの正常臓器においても発現していることが明らかになった。特に低酸素条件下における腫瘍ではCA-I I、CA-I XおよびCA-X I Iが高発現していることから、これらの酵素が細胞外空間の酸性化によって促進される浸潤プロセスに機能的に関与する可能性があることがさらに示唆されている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の一例は、炭酸脱水素酵素に結合する抗体およびその抗原結合断片に関する。 20

【0006】

本発明の一例は、前記抗体または抗原結合断片をコーディングする核酸分子、前記核酸分子を含むベクターおよび宿主細胞に関する。

【0007】

本発明の一例は、前記抗体、核酸分子、ベクター、および／または宿主細胞を含む炭酸脱水素酵素関連疾患の探知または診断方法、または診断キットに関する。

【0008】

本発明の一例は、前記抗体、核酸分子、ベクター、および／または宿主細胞を含む炭酸脱水素酵素関連疾患の予防、治療、または軽減用組成物または用途に関する。

【0009】

本発明の一例は、前記抗体、核酸分子、ベクター、および／または宿主細胞を含む組成物を炭酸脱水素酵素関連疾患を有する対象に投与する段階を含む、炭酸脱水素酵素関連疾患の予防、治療、または軽減方法に関する。 30

【0010】

本発明の一例は、前記抗体、核酸分子、ベクター、および／または宿主細胞を含む固形癌または固形癌細胞の大きさの減少や、腫瘍退化の誘導または促進用組成物、または方法に関する。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、炭酸脱水素酵素を認識し結合する抗体、前記抗体または抗原結合断片をコーディングする核酸分子、前記核酸分子を含むベクターおよび宿主細胞および前記抗体またはその抗原結合断片のCA-X I I陽性の固形癌の軽減、予防、治療または診断用途に関する。 40

【0012】

本発明による抗体は、炭酸脱水素酵素を特異的に認識し結合する抗体である。具体的には、本発明の抗体は、CA-X I Iに結合し、具体的には抗体が結合する部位である抗原決定部位は、N-末端に位置するCA-X I Iの非触媒部位 (non-catalytic region) である。前記CA-X I Iは、ヒト由来酵素であることが好ましい。具体的には、ヒト由来CA-X I Iのアミノ酸配列を配列番号5に示す。

【0013】

本発明による「触媒ドメイン」という用語は、当該技術分野において周知の用語であり、なお一層、本発明とのバランスからは、炭酸から重炭酸塩およびプロトンへの触媒が発生する、C A-X I I の領域に関する。そこで、本発明による「非触媒ドメイン」とは、前記炭酸から重炭酸塩およびプロトンへの触媒が発生する領域である、触媒ドメイン以外の領域をいう。本明細書において、前記C A-X I I の非触媒ドメインは、N-末端の非触媒ドメインであり、好ましくは、前記非触媒部位は、ヒト由来C A-X I I アイソタイプ I のアミノ酸配列（配列番号 5）におけるN-末端の 1 番目～93 番目のアミノ酸で構成されたペプチドまたはその断片を意味することができる。

【0014】

本発明による抗体が結合する抗原の部位は、前記非触媒部位またはその断片であってもよいし、つまり、ヒト由来C A-X I I アイソタイプ I のアミノ酸配列（配列番号 5）におけるN-末端の 1 番目～93 番目のアミノ酸で構成されたペプチドまたはその断片、配列番号 5 のアミノ酸配列のうち、N-末端の 25 番目～93 番目、または 25 番目～57 番目のアミノ酸で構成されたペプチドまたはその断片であってもよい。

10

【0015】

具体例として、本発明による抗体が結合する抗原の部位または抗原決定部位（エピトープ）は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 または配列番号 4 のアミノ酸配列を含む、連続する 7 個のアミノ酸～93 個のアミノ酸の長さ、7 個のアミノ酸～69 個のアミノ酸の長さ、7 個のアミノ酸～33 個のアミノ酸の長さ、14 個のアミノ酸～93 個のアミノ酸の長さ、14 個のアミノ酸～69 個のアミノ酸の長さ、14 個のアミノ酸～33 個のアミノ酸の長さ、19 個のアミノ酸～93 個のアミノ酸の長さ、19 個のアミノ酸～69 個のアミノ酸の長さ、または 19 個のアミノ酸～33 個のアミノ酸の長さを有するペプチドであってもよい。

20

【0016】

さらに具体的には、前記抗体が結合する抗原の部位または抗体の抗原決定部位（エピトープ）は、配列番号 5 のアミノ酸配列のうち、配列番号 1 のアミノ酸配列を必須として含み、連続する 7 個のアミノ酸～93 個のアミノ酸の長さまたは 7 個のアミノ酸～69 個のアミノ酸の長さを有するペプチドであってもよいし、好ましくは、配列番号 5 のアミノ酸配列のうち、配列番号 2 のアミノ酸配列を必須として含み、連続する 14 個のアミノ酸～93 個のアミノ酸の長さまたは 14 個のアミノ酸～69 個のアミノ酸の長さを有するペプチド、さらに好ましくは、配列番号 2 のアミノ酸配列のうち、配列番号 1 のアミノ酸配列を必須として含み、連続する 7 個～14 個のアミノ酸の長さを有するペプチド、最も好ましくは、配列番号 1 または配列番号 2 のアミノ酸配列からなるペプチドであってもよい。

30

【0017】

ヒト由来C A-X I I のアミノ酸配列の配列番号 5 のアミノ酸配列のうち、配列番号 1 のアミノ酸配列は、32 番目～38 番目のアミノ酸を含み、配列番号 2 のアミノ酸配列は、25 番目～38 番目のアミノ酸を含む。

【0018】

あるいは、前記抗体が結合する抗原の部位または抗体の抗原決定部位（エピトープ）は、配列番号 5 のアミノ酸配列のうち、配列番号 3 のアミノ酸配列を必須として含み、連続する 14 個のアミノ酸～93 個のアミノ酸の長さまたは 14 個のアミノ酸～69 個のアミノ酸の長さを有するペプチドであってもよいし、好ましくは、配列番号 5 のアミノ酸配列のうち、配列番号 4 のアミノ酸配列を必須として含み、連続する 19 個のアミノ酸～93 個のアミノ酸の長さまたは 19 個のアミノ酸～69 個のアミノ酸の長さを有するペプチド、さらに好ましくは、配列番号 4 のアミノ酸配列のうち、配列番号 3 のアミノ酸配列を必須として含み、連続する 14 個～19 個のアミノ酸の長さを有するペプチド、最も好ましくは、配列番号 3 または配列番号 4 のアミノ酸配列からなるペプチドであってもよい。

40

【0019】

ヒト由来C A-X I I のアミノ酸配列の配列番号 5 のアミノ酸配列のうち、配列番号 3 のアミノ酸配列は、39 番目～52 番目のアミノ酸を含み、配列番号 4 のアミノ酸配列は

50

、 39 番目～ 57 番目のアミノ酸を含む。

【 0020 】

本発明において、抗原であるヒト由来 C A - X I I のアミノ酸配列の配列番号 5 のアミノ酸配列と、配列番号 1～4 の抗原決定部位のアミノ酸配列を下記表 1 にまとめる。

【表 1】

説明	アミノ酸配列	配列番号
抗原決定部位 Humanized 27B6	WTYFGPD	1
抗原決定部位 Humanized 27B6	APVNGSKWTYFGPD	2
抗原決定部位 Humanized 4B4	GENSWSKYPSCGG	3
抗原決定部位 Humanized 4B4	GENSWSKYPSCGGLLQSP	4
ヒト由来 C A X I I のアミノ酸配列	MPRRSLHAAVLLLVILKEQPSSPAPVNGSKWTYFGPDGENSWSKYPSCGGLLQSPIDLHSDILQYDASLTPLFQGYNLSANKQFLLTNNGHSVKLNLPSDMHIQGLQSRYSATQLHLHWGNPNDPHGSEHTVSGQHFAAELHIVHYNSDLYPDASTASNKSEGLAVLAVLIEMGSFNPSYDKIFSHLQHVKYKGQEAFFVPGFNIEELLPERTAEYYRYRGSLLTPPCNPTVLWTVFRNPVQISQEQLLALETALYCTHMDPSPREMINNFRQVQKFDERLVYTSFSQVQVCTAAGLSLGIILSLALAGILGICIVVVSIWLFRRRSIKKGDNKGVIYKPATKMETEAHA	5

【 0021 】

本発明による抗体は、炭酸脱水素化酵素の非触媒部位を特異的に認識し結合する抗体でマウス抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体を含む。炭酸脱水素化酵素の非触媒部位は、ヒト由来 C A - X I I アイソタイプ I のアミノ酸配列（配列番号 5）における N-末端の 1 番目～ 93 番目のアミノ酸で構成されたペプチドまたはその断片、25 番目～ 93 番目のアミノ酸で構成されたペプチド、または 25 番目～ 57 番目のアミノ酸で構成されたペプチドまたはこれらペプチドの断片であってもよい。

【 0022 】

前記抗体の一例は、ヒト由来 C A - X I I アイソタイプ I のアミノ酸配列（配列番号 5）における N-末端の 1 番目～ 93 番目のアミノ酸で構成されたペプチド、または配列番号 5 のアミノ酸配列のうち、配列番号 1、好ましくは、配列番号 2 のアミノ酸配列を必須として含むペプチド断片に結合することができる。

【 0023 】

本発明の一例において、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むペプチドに結合する抗体であって、前記抗体の一例は、受託番号 K C L R F - B P - 00280 ハイブリドーマ細胞により生産された抗体の重鎖可変部位の C D R 1～C D R 3 と、軽鎖可変部位の C D R 1～C D R 3 を含むことができる。前記ハイブリドーマ細胞株は、大韓民国、ソウル市、鍾路区、蓮建洞 28 所在のソウル大学癌研究所韓国細胞株研究財団に 2012 年 2 月 14 日付で寄託し、2012 年 2 月 20 日付で受託番号 K C L R F - B P - 00280 を与えられた。前記受託番号 K C L R F - B P - 00280 ハイブリドーマが生産する抗体を 27B6 と名付け、配列番号 12 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 13 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体である。

【 0024 】

具体的には、本発明による抗体の一例は、配列番号 6～8 のアミノ酸配列を含む V_H 領域の C D R および配列番号 9～11 のアミノ酸配列を含む V_L 領域の C D R からなる群より選択された 1 種以上のアミノ酸配列を含むことができ、好ましくは、V_H 領域の C D R

を決定するアミノ酸配列として配列番号6 (CDR1)、配列番号7 (CDR2) および配列番号8 (CDR3) および／またはV_L領域のCDRを決定するアミノ酸配列の配列番号9 (CDR1)、配列番号10 (CDR2) および配列番号11 (CDR3) のアミノ酸配列を含む。また、本発明による抗体は、配列番号12のアミノ酸を含むV_H領域および配列番号13のアミノ酸配列を含むV_L領域を含むことができる。

【0025】

前記抗体の一例は、ヒト由来CA-XIIアイソタイプIのアミノ酸配列 (配列番号5) におけるN-末端の1番目～93番目のアミノ酸で構成されたペプチド、または配列番号5のアミノ酸配列のうち、配列番号3、好ましくは、配列番号4のアミノ酸配列を必須として含むペプチド断片に結合することができる。

10

【0026】

本発明の一例において、配列番号3のアミノ酸配列を含むペプチドに結合する抗体であって、前記抗体の一例は、受託番号KCLRF-BP-00279ハイブリドーマ細胞により生産された抗体の重鎖可変部位のCDR1～CDR3と、軽鎖可変部位のCDR1～CDR3とを含むことができる。前記ハイブリドーマ細胞株は、大韓民国、ソウル市、鍾路区、蓮建洞28所在のソウル大学癌研究所韓国細胞株研究財団に2012年2月14日付で寄託し、2012年2月20日付で受託番号KCLRF-BP-00279を与えられた。前記受託番号KCLRF-BP-00279を有するハイブリドーマが生産する抗体を4B4と名付け、配列番号20のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体である。

20

【0027】

具体的には、本発明による抗体の一例は、配列番号14～16のアミノ酸配列を含むCDRおよび配列番号17～19のアミノ酸配列を含むCDRからなる群より選択された1種以上のCDRを含む抗体であってもよいし、好ましくは、V_H領域のCDRを決定するアミノ酸配列として配列番号14 (CDR1)、配列番号15 (CDR2) および配列番号16 (CDR3) および／またはV_L領域のCDRを決定するアミノ酸配列の配列番号17 (CDR1)、配列番号18 (CDR2) および配列番号19 (CDR3) のアミノ酸配列を含む。また、本発明による抗体は、配列番号20のアミノ酸を含むV_H領域および配列番号21のアミノ酸配列を含むV_L領域を含むことができる。

【0028】

前記マウス抗体またはキメラ抗体の一例によるCDR配列と可変領域配列を下記表にまとめる。

30

【表 2】

命名	アミノ酸配列	配列番号
27B6 V _H -CDR1	GYSFTNYW	6
27B6 V _H -CDR2	IDPSDSET	7
27B6 V _H -CDR3	TRGIRGGYYA MDY	8
27B6 V _L -CDR1	QDISNY	9
27B6 V _L -CDR2	YTS	10
27B6 V _L -CDR3	QQGDTLPRT	11
27B6 V _H	QVQLQQSGPQ LVWPGASVKI SCNTSGYSFT NYWIHWVKQR PGQGLEWIGM IDPSDSETRL NQKFKDKTTL TVDRSSSTAY MQVSSSTSED SAVYYCTRGI RGGYYAMDYW GQGTSVTVSS	12
27B6 V _L	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP EGTVKLLIYY TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GDTLPRTFGE GTKLEIR	13
4B4 V _H -CDR1	GYSYTDYN	14
4B4 V _H -CDR2	IDPANGDT	15
4B4 V _H -CDR3	ARPIYYGVYW YFDV	16
4B4 V _L -CDR1	KSLHNSGNT Y	17
4B4 V _L -CDR2	RMS	18
4B4 V _L -CDR3	MQHLEYPFT	19
4B4 V _H	EIQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYSYT DYNIIWVRQS QGKSLDWIGY IDPANGDTTY NQKFKGKATL TVDKSSSTAF MHLNSLTSDG SAVYFCARPI YYGVYWFYFDV WGAGTTVTVS	20
4B4 V _L	DIVMTQAAPS VPVTPGESVS ISCRSSKSLI HSNGNTYLYW FLQRPQGSPQ LLIRMSNLA SGVPDRFSGS GSGTAFTLRI SRVEAEDVGV YYCMQHLEYP FTFGSGTKLE IK	21

【0029】

本発明の具体的な一例により、配列番号 1 を含む抗原決定部位に結合する抗体と、配列番号 3 を含む抗原決定部位に結合する抗体は、1 つの抗原に共に結合可能である。したがって、前記 2 つの抗体を用いて C A - X I I 抗原に対するサンドイッチ E L S I A 分析などを行うことができ、特に、サンドイッチ E L I S A 分析で配列番号 1 を含む抗原決定部位に結合する抗体、例えば、27B6 抗体を C A P T U R E 抗体として、配列番号 3 を含む抗原決定部位に結合する抗体、例えば、4B4 抗体を D E T E C T O R 抗体として用いることがさらに好ましい。

【0030】

本発明により、C A - X I I 抗原に結合するヒト化抗体（以下、D N P 0 0 4 という）は、C A - X I I に特異的に結合するマウス単クローン抗体 4 B 4 （受託番号 K C L R F - B P - 0 0 2 7 9 ）の軽鎖および重鎖可変領域の遺伝子を鋳型として作製した抗体であって、一例は、配列番号 14、15 および 28 のアミノ酸配列を含む V_H 領域の C D R および配列番号 29、30 および 31 のアミノ酸配列を含む V_L 領域の C D R からなる群より選択された 1 種以上のアミノ酸配列を含む抗体であってもよい。

【0031】

配列番号 29：A S S X₁ V T Y （X₁ = P o r S）

配列番号 30：X₂ T S X₃ L X₄ X₅ （X₂ = A、G o r R；X₃ = S、R、H、Q、D、E、M；X₄ = A、V、I o r M；X₅ = P o r S）

【0032】

前記抗体の V_L 領域の C D R 1 は、配列番号 29 の一般式で表現され、具体的な一例は、配列番号 32 または 33 のアミノ酸配列を含むことができ、V_L 領域の C D R 2 は、配

10

20

30

40

50

列番号 30 の一般式で表現され、具体的な一例は、配列番号 33～42 からなる群より選択されたアミノ酸配列を含むことができる。

【0033】

前記ヒト化抗体（DNP004）の一例による CDR 配列と可変領域配列を下記表にまとめる。下記表 3 の配列番号 32 番目～42 番目の配列において、濃く表示した部分は、変形されたアミノ酸配列を示す。

【表 3】

命名	CDR	アミノ酸配列	配列番号
DNP004 V _H	CDR1	GYSYTDYN	14
DNP004 V _H	CDR2	IDPANGDT	15
DNP004 V _H	CDR3	SRPIYYGAYWYFDV	28
DNP004 V _L 一般式	CDR1	ASSX ₁ VTY (X ₁ =P or S)	29
DNP004 V _L 一般式	CDR2	X ₂ TSX ₃ LX ₄ X ₅ (X ₂ =A, G or R; X ₃ =S, R, H, Q, D, E, M; X ₄ =A, V, I or M; X ₅ =P or S)	30
DNP004 V _L	CDR3	QQWSSNPLT	31
DNP004 V _L	CDR1	ASSPVTY	32
DNP004 V _L	CDR1	ASSSVTY	33
DNP004 V _L	CDR2	ATSSLAP	34
DNP004 V _L	CDR2	ATSSLVS	35
DNP004 V _L	CDR2	GTSRLVS	36
DNP004 V _L	CDR2	ATSHLVS	37
DNP004 V _L	CDR2	GTSQLVS	38
DNP004 V _L	CDR2	RTSDLIS	39
DNP004 V _L	CDR2	ATSELMS	40
DNP004 V _L	CDR2	GTSMLAS	41
DNP004 V _L	CDR2	ATSSLAS	42

【0034】

本発明によるヒト化抗体（DNP004）の一例が含むフレームワーク配列を下記表 4 にまとめ、前記抗体は、重鎖可変領域のフレームワーク 1～4 および軽鎖可変領域のフレームワーク 1～4 のアミノ酸配列からなる群より選択された 1 種以上のフレームワーク配列を含む抗体であってもよい。重鎖可変領域のフレームワーク 1～4 のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 43～46 を含むことができ、軽鎖可変領域のフレームワーク 1～4 のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 47、48、51 および 52 を含むことができる。前記軽鎖可変領域のフレームワーク 2 は、配列番号 48 の一般式で表現され、具体的な一例は、配列番号 49 または 50 のアミノ酸配列を含むことができる。

【0035】

配列番号 48：MHWYX₆QKPGKAPX₇PWLY (X₆=Q or H; H₇=R or K)

【0036】

前記ヒト化抗体（DNP004）の一例によるフレームワーク配列を下記表にまとめる。

10

20

30

40

【表 4】

命名	アミノ酸配列	配列 番号
Frame work #1 of V _H -humanized	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	43
Frame work #2 of V _H -humanized	IYWVRQAPGKGLEWVG	44
Frame work #3 of V _H -humanized	TYNQKFQGRATISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YC	45
Frame work #4 of V _H -humanized	WGQGTLLTVSS	46
Frame work #1 of V _L -humanized	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR	47
Frame work #2 of V _L -humanized 一般式	MHWYX ₆ QKPGKAPX ₇ PWIY (X ₆ = Q or H; X ₇ =R orK)	48
Frame work #2 of V _L -humanized	MHWYQQKPGKAPRPWIY	49
Frame work #2 of V _L -humanized	MHWYHQKPGKAPKPWIY	50
Frame work #3 of V _L -humanized	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	51
Frame work #4 of V _L -humanized	FGQGTKVEIK	52

10

【0037】

一例として、本発明によるヒト化抗体（DNP004）は、配列番号53のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号54～63からなる群より選択されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含むことができる。

20

【0038】

本発明によるヒト化抗体（DNP004）は、図31に示すように、キメリック4B4抗体より抗原結合能力が高い抗体を候補群の中から選定し（実施例16）、これは、多様な細胞株においてもより高い細胞結合能力を示して（実施例18）、マウスまたはキメラ抗体に内在した免疫原性の可能性を大きく減少させると共に、ヒト化抗体（DNP004）がキメリック4B4抗体より優れていることを示す。

【0039】

本発明による抗体またはその断片は、腫瘍退化（tumor regression）活性および腫瘍細胞株に対して直接的な抑制効果を有する。本明細書において、腫瘍の退化は、腫瘍の大きさの減少および／または腫瘍細胞の成長阻害、中断または減少などを誘導または促進することを含む。腫瘍の大きさの減少は、例えば、本発明の抗体またはその断片を含む組成物を処理する前を100%を基準として、前記抗体またはその断片を含む組成物を投与した場合に得られた腫瘍の大きさが97%以下、95%以下、90%以下、85%以下、80%以下、75%以下の大きさを有する場合などが挙げられる。

30

【0040】

本発明による抗体は、抗体-依存性細胞媒介性細胞毒性（ADCC、Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity）と補体系依存（CDC、complement-dependent cytotoxicity）を有する。

【0041】

本発明による抗体は、抗体に結合した糖残基のFUCOSEを一部または全部除去したものであってもよい。本発明によるフコース除去抗体も、固形癌に対する成長抑制および腫瘍退化活性を維持する。一例において、27B6抗体および4B4抗体とも、defucose形態の抗体がfucose形態の抗体に比べて腫瘍に対する効能に優れている（図14、17参照）。

40

【0042】

本発明による抗体または抗原結合断片は、生体から分離された（生体に存在しない）ものまたは非自然に生産（non-naturally occurring）されたものであってもよいし、例えば、合成的または遺伝工学技術で生産されたものであってもよい。前記方法は、公知の技術で容易に実施できる。

50

【0043】

また、本発明は、CA-XII抗原決定部位を認知する物質を提供する。この物質は、抗体、抗体切片、リガンドなどからなる群より選択され、抗体は、単クローンまたは多クローン抗体であってもよいし、好ましくは、ヒトと動物に起源したものである。多クローン抗体または単クローン抗体であってもよいし、例えば、単クローン抗体であってもよい。単クローン抗体は、当業界で広く知られた方法通りに製造される。例えば、phage display手法を利用して製造される。本発明による抗体は、前記マウス抗体、キメラ抗体を含む。

【0044】

用語、「CDR（相補正決定領域）」は、免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の高可変領域（hypervariable region）のアミノ酸配列を意味する。重鎖および軽鎖は、それぞれ3個のCDRを含むことができる（CDRH1、CDRH2、CDRH3およびCDRL1、CDRL2、CDRL3）。前記CDRは、抗体が抗原またはエピトープに結合するうえで主な接触残基を提供することができる。一方、本明細書において、用語、「特異的に結合」または「特異的に認識」は、当業者に通常公知の意味と同じものであって、抗原および抗体が特異的に相互作用して免疫学的反応をすることを意味する。

10

【0045】

用語、「抗原結合断片」は、免疫グロブリン全体構造に対するその断片で、抗原が結合可能な部分を含むポリペプチドの一部を意味する。例えば、scFv、(scFv)₂、scFv-Fc、Fab、Fab'またはF(ab')₂であってもよいが、これに限定されない。

20

【0046】

前記抗CA-XII抗体は、単クローン抗体であってもよい。単クローン抗体は、当業界で広く知られた方法通りに製造される。例えば、phage display手法を利用して製造される。あるいは、抗CA-XII抗体は利用して通常の方法によってマウス由来の単クローン抗体に製造される。

【0047】

一方、典型的なELISA（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）フォーマットを利用して、CA-XIIとの結合能に基づいて個別単クローン抗体をスクリーニングすることができる。結合体に対して分子的相互作用を検定するための競争的ELISA（Competitive ELISA）のような機能性分析または細胞ベースの分析（cell-based assay）のような機能性分析により阻害活性に対して検定することができる。その後、強い阻害活性に基づいて選択された単クローン抗体メンバーに対して、CA-XIIに対するそれぞれの親和度（Kd values）を検定する。

30

【0048】

最終的に選択された抗体は、抗原結合部を除いた残りの部分がヒトの免疫グロブリン抗体化された抗体だけでなく、ヒト化抗体として製造して使用することができる。ヒト化抗体の製造方法は、当業界でよく知られている（Almagro, J. C. and Fransson, J., 「Humanization of antibodies,」 Frontiers in Bioscience, 13 (2008), 1619-1633）。

40

【0049】

他の例は、前記抗CA-XII抗体を生産するハイブリドーマを提供する。具体例において、前記ハイブリドーマは、寄託番号KCLRF-BP-00279またはKCLRF-BP-00280のものであってもよい。

【0050】

他の例は、前記ハイブリドーマが生産する抗CA-XII抗体またはその抗原結合断片を提供する。

50

【0051】

他の例は、前記ハイブリドーマが生産する抗CA-XII抗体の重鎖相補性決定部位（CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、またはこれらの組み合わせ）、軽鎖相補性決定部位（CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、またはこれらの組み合わせ）、またはこれらの組み合わせ；または前記ハイブリドーマが生産する抗CA-XII抗体の重鎖可変領域、軽鎖可変領域、またはこれらの組み合わせを含む抗CA-XII抗体またはその抗原結合断片を提供する。この時、前記相補性決定部位は、通常のすべての方法によって決定可能であり、例えば、IMGT definition (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/) または Cabat definition (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>) によって決定可能であるが、これに制限されるわけではない。

10

【0052】

CA-XII抗体または抗体切片は、多様な標識基（labeling agent）、毒性物質または抗腫瘍剤と結合することができる。当該技術分野における周知の方法によって、本発明の抗体は、前記標識基、毒素、または抗腫瘍剤と結合できることは当業者に明らかである。このような結合は、抗体または抗原の発現後、付着部位に化学的に行うことも可能であり、あるいは、DNAレベルで本発明の抗体または抗原内に結合産物を組み込んでも良い。次に、本明細書において、以下に記載する適切な宿主系においてDNAを発現させ、そして発現させたタンパク質を回収して、必要に応じて再生させる。結合は、当該技術水準において知られたリンカーを介して達成しても良い。特に、この技術と共に、酸性条件あるいは還元条件下、または特定のプロテアーゼに対する露出時に毒素または抗腫瘍剤を放出する、多様なリンカーを用いることができる。特定の様態においては、標識基、毒素、または抗腫瘍剤を多様な長さのスペーサームによって結合させ、潜在的な立体障害を減少させることが好ましい場合もある。

20

【0053】

前記標識基としては、放射線同位元素、ハプテン、蛍光物質、クロモゲン（chromogen）および染色物質からなる群より選択された物質で標識され、具体的には、フラグ（FLAG）、GFP、YFP、RFP、dトマト（dTomato）、チェリー（cherry）、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7、DNP、AMCA、ビオチン、ジゴキシゲニン、タムラ（Tamura）、テキサスレッド、ローダミン、アレクサフルオル（Alexa fluors）、FITC、TRITCから選択される。あるいは、標識基は、例えば、³H、¹⁴C、¹⁵N、³⁵S、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²⁵I、または¹³¹Iなどの放射性同位体であっても良い。適切な標識基の新しい例は、酵素基（例えば、西洋ホースラディッシュペルオキシダーゼ、西洋ワサビガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光基、ビオチニル基、または第2のレポーターによって認識される、予め決定されたポリペプチドエピトープである。

30

【0054】

前記毒性物質としては、細胞または生物に対して毒性を有する任意の化合物に関する。したがって、毒素は、例えば、放射線同位元素、小分子、ペプチド、またはタンパク質でも良い。抗体あるいは抗体切片は、毒性物質と結合して融合タンパク（fusion protein）を形成することができる。毒素タンパク質としては、リシン（ricin）、サポリン（saporin）、ゲロニン（gelonin）、モモルジン（momordin）、ジフテリア毒素、またはシュードモナス毒素（pseudomonas toxin）であってもよいし、放射線同位元素としては、¹³¹I、¹⁸⁸Rhと⁹⁰Yがあるが、これに限定されるものではない。

40

【0055】

前記「抗腫瘍剤」との用語は、本発明によれば、組織の異常増殖を停止させるか、または遅延させるかのいずれか1つが可能な薬剤を特定する。したがって、抗腫瘍剤は、特に癌を治療する時に有用である。抗腫瘍剤は、血管新生阻害剤、DNA挿入剤あるいはDNA架橋剤、DNA合成阻害剤、DNA-RNA転写制御因子、酵素阻害剤、遺伝子制御因

50

子、微小管阻害剤、またはその他の抗腫瘍剤であってもよい。

【0056】

本発明は、本発明による抗体をコードする核酸分子に関する。本発明の抗体をコードする、本発明の核酸分子は、例えば、DNA、cDNA、RNAまたは合成により産生されるDNAあるいはRNA、あるいはこれらの核酸分子のいずれか1つを単独でまたは組み合わせて含む組換え技術により産生されるキメラ核酸分子でも良い。核酸分子はさらに、遺伝子全体あるいはその相当部分、またはその断片および誘導体に対応するゲノムDNAでも良い。抗体のアミノ酸配列のうち、1つのアミノ酸が置換されているこれらの配列をコードする核酸を含むのに必要な単一または複数のヌクレオチド置換、欠失または付加をヌクレオチド配列が含有しても構わない。本発明の特に好ましい実施形態においては、核酸分子は、cDNA分子である。

10

【0057】

本発明の一実施形態はまた、核酸分子が発現可能な形態で含むベクターにも関する。本発明のベクターは、例えば、ファージベクター、プラスミドベクター、ウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターでも良い。レトロウイルスベクターは、複製可能でも良く、あるいは複製欠損でも良い。後者の場合、ウイルス増殖は、一般に補完宿主／細胞 (complementing host/cells) で発生する。

【0058】

前記に引用する核酸分子を他のポリヌクレオチドという翻訳融合が発生するように、ベクター内に挿入することができる。一般に、ベクターは、1以上の複製起点 (ori) およびクローニングまたは発現に関する遺伝系 (inheritance systems for cloning or expression)、宿主の選択のための1以上のマーカー、例えば、抗生物質耐性および1以上の発現カセットを含有することができる。適切な複製起点 (ori) には、例えば、Col E1、SV40ウイルスおよびM13の複製起点が含まれる。

20

【0059】

本明細書において上述する核酸分子は、宿主への直接導入、あるいはリポソーム、ファージベクターまたはウイルスベクター (例えば、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター) を介した導入のために設計される。また、バキュロウイルスシステム、またはワクチニアウイルスあるいはセムリキフォレストウイルスに基づくシステムを、本発明の核酸分子のための真核生物発現システムとして用いることができる。

30

【0060】

本発明の他の実施形態は、本発明のベクターを含む非ヒト宿主に関する。前記宿主は、原核細胞または真核細胞でも良い。宿主細胞中に存在する本発明のポリヌクレオチドまたはベクターは、宿主細胞のゲノム内に結合していても良く、あるいは染色体外に維持されているいずれでも良い。

【0061】

本発明はさらに、本発明の抗体を生産するのに用いられる、本発明の1以上の核酸分子を含む遺伝子移植非ヒト動物にも関する。ヤギ、ウシ、ウマ、ブタ、ラット、マウス、ウサギ、ハムスターまたはその他の哺乳動物の組織、または牛乳、血液あるいは小便などの体液において抗体を生産して、これらから回収することも可能である。

40

【0062】

また、本発明は、CA-XII抗原決定部位を選択的に認知する物質を生産する方法と、抗体を生産する生産株を提供する。CA-XIIの抗原決定部位に対する抗体または抗体切片は、CA-XIIタンパク質、CA-XIIの抗原決定部位、CA-XIIの抗原決定部位を含むCA-XIIタンパク質の一部、またはCA-XIIの抗原決定部位を発現する細胞を抗原として用いて、通常の方法で製造可能である。一例として、CA-XII抗体の製造方法は、(a) CA-XIIタンパク質、CA-XIIの抗原決定部位、CA-XIIの抗原決定部位を含むCA-XIIタンパク質の一部、またはCA-XIIの抗原決定部位を発現する細胞を動物に注入して免疫化させる段階、(b) CA-XIIに

50

特異的な抗体を生産する脾臓細胞を得る段階、および（c）前記脾臓細胞を骨髄腫細胞と融合させて、CA-XIIに対する抗体を生産するハイブリドーマ細胞を選別する段階を含むCA-XII抗体を生産する生産株の製造方法により実施可能である。前記生産株は、生体外（*in vitro*）で培養したり、生体内注入して抗体を分離することができる。一例として、マウスの腹腔内に挿入し、腹水から分離、精製する。単クローン抗体の分離および精製は、培養上層液または腹水をイオン交換クロマトグラフィー（DEAEまたはDE52など）、抗免疫グロブリンカラムまたはプロテインAカラムなどの親和性クロマトグラフィーを用いて実施することができる。

【0063】

本発明による抗体が結合する抗原決定部位は、固形癌特異的な発現を示す。したがって、CA-XII抗体は、腫瘍細胞の検出に有用に使用できるだけでなく、毒性物質を含めて腫瘍細胞のみ特異的に細胞殺傷（*cytotoxicity*）させることができる。

10

【0064】

他の例は、CA-XII、具体的には、CA-XIIの非触媒領域に位置する抗原決定部位の固形癌の検出のためのマーカーとしての用途を提供する。抗原決定部位と相互作用する物質を含む固形癌の癌幹細胞検出用組成物を提供する。前記相互作用する物質は、CA-XII、具体的には、CA-XIIの非触媒領域に位置する抗原決定部位と相互作用可能なすべての物質、例えば、化学物質（*small molecular chemical*）、抗体、抗体の抗原結合断片、アプタマーなどからなる群より選択された1種以上であってもよい。

20

【0065】

他の実施形態において、本発明は、本発明の抗体、本発明の核酸分子、本発明のベクターまたは本発明の宿主を含む診断組成物に関する。本明細書において用いられる組成物とは、本発明の少なくとも1つの抗体、核酸分子、ベクターおよび／または宿主を含む組成物を定義するものである。

【0066】

本発明の診断組成物は、多様な細胞、組織または他の適切な試料における、CA、特にCA-XIIの好ましくない発現または過剰発現の検出であって、試料を本発明の抗体と接触させること、および試料においてCA、特にCA-XIIの存在を検出することを含む検出に有用である。したがって、本発明の診断組成物を以下に定義する発病または疾患状態を評価するために用いても良い。特にCA、特にCA-XIIを発現する、癌細胞などの悪性細胞を本発明の抗体、抗体断片または誘導体でターゲティングしても良い。本発明の抗体が結合した細胞は、そのため、補体系などの免疫系機能によって、または細胞媒介性細胞毒性によって攻撃され、したがって、CA、特にCA-XIIの好ましくない発現または過剰発現を示す細胞の数が減少するか、またはこのような細胞が根絶される。

30

【0067】

本発明の一態様においては、本発明の抗体、抗体断片または誘導体を標識基に結合させる。このような抗体は、診断アプリケーションに特に適合する。

【0068】

本発明の診断組成物は、単独活性薬剤として投与可能であり、または他の薬剤と組み合わせて投与される。

40

【0069】

腫瘍細胞の検査方法は、（a）CA-XII抗体を腫瘍細胞を含む試料に反応させ、（b）前記抗体に対して陽性反応を示す試料を腫瘍として判断するものである。前記試料は、リンパ液、骨髄、血液または血球であってもよいが、これに限定されるものではない。前記腫瘍細胞は、好ましくは、乳癌、肺癌、大腸癌、胃癌、前立腺癌、または肝癌細胞であってもよい。

【0070】

前記CA-XII抗体を用いて腫瘍細胞を検査する場合、前記CA-XII抗体は、抗原-抗体反応性を確認できる物質で標識されたものであってもよい。使用可能な前記物質

50

としては、放射性同位元素、蛍光物質、発光物質、クロモゲン (chromogen)、またはその他の染色物質などがある。

【0071】

また、本発明のCA-XII抗体は、固形癌を診断するための診断キットとして提供される。

前記診断キットは、CA-XII抗体のほか、抗原-抗体反応検出手段を含むことができる。前記検出手段は、流細胞測定、免疫組織化学染色、酵素結合免疫吸着分析 (enzyme linked immunosorbent assay: ELISA)、放射線免疫測定法 (radioimmunoassay: RIA)、酵素免疫分析 (enzyme immunoassay: EIA)、蛍光免疫分析 (Fluorescence immunoassay: FIA) および発光免疫分析 (luminescence immunoassay: LIA) からなる群より選択された方法を実施するための通常のも 10
物質であってもよい。つまり、標識手段としては、酵素の場合、HRP (horse radish peroxidase) があり、蛍光物質としてはFITC (Fluorescein thiocarbamyl ethylenediamine) が、発光物質としてはルミノール (luminol)、イソルミノールおよびルシゲニン (lucigenin) が、放射線同位元素としては¹²⁵I、³H、¹⁴Cおよび¹³¹Iがあるが、これに限定されるものではない。前記標識手段による標識の有無は、酵素の基質や、蛍光、発光または放射線を測定するためのツールを用いて確認可能である。一例として、CA-XII抗体は、ELISAキットまたはストリップキットに製造される。 20

【0072】

本発明の具体的な一例による27B6と4B4抗体は、抗原結合部位が重なっておらず、1つの抗原に共に結合可能である。したがって、前記2つの抗体を用いてCA-XII抗原に対するサンドイッチELISA分析などを行うことができ、特にサンドイッチELISA分析において27B6抗体をCAPTURE抗体として、4B4抗体をDETECTOR抗体として用いることがさらに好ましい。

【0073】

一実施例において、本発明は、本発明の抗体、本発明の核酸分子、本発明のベクターまたは本発明の宿主を含む医薬組成物に関する。本発明の一実施形態によれば、本発明の抗体、本発明の核酸分子、本発明のベクターまたは本発明の宿主は、固形癌を治療または阻 30
害するのに用いるためのものである。本発明の核酸分子、本発明のベクターまたは本発明の宿主の有効量を投与の必要がある対象に投与することによって、固形癌を治療または阻害するための方法である。

【0074】

本発明による「固形癌」との用語は、嚢胞または液体領域を通常は含有しない組織の異常な塊を定義するものである。固形癌は、陽性（癌ではない）または悪性（当該技術分野において癌とよく称される）をすべて含む。本発明による抗体を適用可能な固形癌の例は、肉腫、神経膠腫、癌腫瘍、中皮腫、リンパ腫、腎臓腫瘍、肺腫瘍、乳房腫瘍、子宮頸部腫瘍、卵巣腫瘍、結腸直腸腫瘍、肝臓腫瘍、前立腺腫瘍、脾臓腫瘍および頭頸部腫瘍から 40
選択され、好ましくは、乳癌、肺癌、大腸癌、胃癌、前立腺癌、または肝癌である。前記乳癌は、好ましくは、三重陰性乳癌 (Triple-negative breast cancers (TNBC)) も含み、前記三重陰性乳癌は、HER2、estrogen receptor (ER)、およびprogesterone receptor (PR) を含む3つの乳癌診断マーカーによってもすべて陰性として検出される乳癌であって、検出が非常に難しい問題点がある。前記肺癌は、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、腺癌、腺の扁平上皮癌であってもよい。

【0075】

前記固形癌の治療効果は、癌細胞（特に、癌幹細胞）またはこれを含む癌組織の成長抑制（量的減少）、死滅 (apoptosis) 効果だけでなく、移動 (migration)、侵襲 (invasion)、転移 (metastasis) などを抑制して、これ 50

による癌の悪化を抑制する効果を含む。

【0076】

本明細書において、「対象」または「患者」は、固形癌の軽減、予防および／または治療を必要とする患者を意味するもので、すべての哺乳類、例えば、ヒト、サルなどの霊長類、マウス、ラットなどの齧歯類であってもよく、固形癌を病んでいたり固形癌の症状を有したり、固形癌発病の危険がある患者であってもよい。

【0077】

本発明による抗体あるいは抗体切片の投与は、許容されたすべての薬物投与方法によって施される。具体的には、例えば、CA-XII抗体を有効成分として含む治療剤を腫瘍細胞を有する対象、つまり、ヒトまたは動物に経口または非経口、好ましくは、非経口投与することである。前記治療剤は、薬理学的に許容可能な賦形剤を含むことができ、その投与量は、患者の状態に応じて適切に調節することが好ましいが、一例として、1日、3mg～6,000mgであってもよい。治療剤の剤形は、液剤、散剤、乳剤、懸濁剤、または注射剤であってもよいが、これに限定されるものではない。

10

【0078】

本発明は、CA-XII抗原決定部位に対する抗体、抗体切片(F(ab')₂、FabおよびFvなど)、およびリガンドからなる群より選択された抗体を用いて、急性白血病、母細胞危機の発生した慢性白血病およびリンパ芽球リンパ腫を治療する方法を提供する。

【0079】

20

抗体あるいは抗体切片は、好ましくは、単クローンまたは多クローン抗体からなる群より選択され、好ましくは、ヒトと動物に起源するものである。前記CA-XII抗体または抗体切片は、前記で言及した毒素物質がさらに含まれたものであってもよい。毒素物質は、抗体に融合、接合、結合、またはリンクされてもよいし、これは、公知の技術で実施可能である。

【0080】

本発明の医薬組成物は、単独活性薬剤として投与しても良く、またはその他の薬剤と組み合わせ、好ましくは、当該技術分野において問題の疾患の治療に適すると知られたものと組み合わせて投与しても良い。また、本発明の抗体を投与する方法は、他の抗癌治療、例えば、化学療法、放射線療法、細胞治療剤と並行して行うことができる。前記化学療法または細胞治療剤に使用される多様な固形癌治療抗癌剤は、知られた抗癌剤を使用することができる。

30

【0081】

他の例は、CA-XII、具体的には、CA-XIIの非触媒領域に位置する抗原決定部位に候補化合物を接触させる段階、および前記抗原決定部位に結合する候補化合物を選択して固形癌治療剤の候補物質として決定する段階を含む、固形癌治療剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。他の例において、前記のようにスクリーニングされた固形癌治療剤を有効成分として含む固形癌の治療用薬学組成物を提供する。

【0082】

前記候補化合物は、人工的に合成されるか、天然の各種化合物、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド構造体またはタンパク質構造体(例えば、抗体、抗体の抗原結合断片、ペプチボディ、ナノボディなど)、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、アンチセンス-RNA、shRNA(short hairpin RNA)、siRNA(small interference RNA)、アプタマー、天然物抽出物などからなる群より選択された1種以上であってもよい。

40

【0083】

前記候補化合物と抗原決定部位の結合は、候補化合物と抗原決定部位の複合体の形成を確認することにより行われ、これは、当業界で公知の多様な方法により行うことができる。例えば、通常の酵素反応、蛍光、発光および／または放射線の検出により測定可能であり、具体的には、免疫クロマトグラフィー(Immunochromatography

50

)、免疫組織化学染色 (Immunohistochemistry)、酵素結合免疫吸着分析 (enzyme linked immunosorbent assay: ELISA)、放射線免疫測定法 (radioimmunoassay: RIA)、酵素免疫分析 (enzyme immunoassay: EIA)、蛍光免疫分析 (Fluorescence immunoassay: FIA)、発光免疫分析 (luminescence immunoassay: LIA)、ウェスタンブロッティング (Western blotting) などからなる群より選択された方法により測定可能であるが、これに制限されるわけではない。

【発明の効果】

【0084】

10

本発明は、炭酸脱水素酵素を認識し結合する抗体、前記抗体または抗原結合断片をコーディングする核酸分子、前記核酸分子を含むベクターおよび宿主細胞および前記抗体またはその抗原結合断片の炭酸脱水素化酵素関連疾病、例えば、固形癌の軽減、予防、治療または診断用途に関する。

【図面の簡単な説明】

【0085】

【図1】実施例1により固形癌特異的なマウス単クローン抗体27B6の末梢血液での反応度検査を示す。

【図2】実施例2により27B6キメラ抗体の抗原特異性および親和度を確認した結果を示す。

20

【図3】実施例3によるマウス単クローン抗体4B4の抗原反応度のスクリーニング過程を示す。

【図4】実施例4により4B4キメラ抗体の抗原特異性および親和度を確認した結果を示す。

【図5A】実施例6により多様な乳癌細胞で4B4キメラ抗体のCarbonic anhydrase 12抗原に対する発現様相を確認した結果を示す。

【図5B】実施例6により多様な乳癌細胞で4B4キメラ抗体のCarbonic anhydrase 12抗原に対する発現様相を確認した結果を示す。

【図5C】実施例6により多様な乳癌細胞で4B4キメラ抗体のCarbonic anhydrase 12抗原に対する発現様相を確認した結果を示す。

30

【図6】実施例6により27B6キメラ抗体および4B4キメラ抗体で作製したカラムで肺腺癌A549細胞株溶解物からそれぞれの抗原を分離精製して得られた試料を電気泳動で確認した結果である。

【図7】実施例6によりマウス単クローン抗体4B4およびマウス単クローン抗体27B6に対する抗原がCarbonic anhydrase 12であることをELISA assayで検証した結果である。

【図8】実施例6によりマウス単クローン抗体4B4およびマウス単クローン抗体27B6に対する抗原がCarbonic anhydrase 12であることをWestern blotting assayで検証した結果である。

【図9】実施例7によりマウス単クローン抗体27B6およびマウス単クローン抗体4B4のエピトープマッピングを示す実験および結果である。

40

【図10】実施例8により27B6キメラ抗体が補体依存性細胞毒性を示すことを確認できたものである。

【図11】実施例9-1により27B6キメラ抗体の抗体依存性細胞毒性効果を確認した結果である。

【図12】実施例9-2により27B6キメラ抗体の三重陰性乳癌細胞株における抗体依存性細胞毒性効果を確認した結果である。

【図13】実施例10-1により多様な固形癌細胞株におけるdefucosylated 27B6キメラ抗体の抗体依存性細胞毒性検査を示す。

【図14】実施例10-2により乳癌細胞株におけるLuciferase assay

50

を用いたDefucosylated 27B6、4B4キメラ抗体の抗体依存性細胞毒性検査を示す。

【図15】実施例11により三重陰性乳癌細胞株におけるCA-XII抗原の発現程度と27B6、4B4キメラ抗体の結合の有無を確認した結果である。

【図16】三重陰性乳癌動物モデルにおける27B6キメラ抗体および4B4キメラ抗体が腫瘍の成長を抑制していることを示した結果である。

【図17】実施例11により三重陰性乳癌に対する4B4抗体の有効性の結果を示す。

【図18】実施例12により4B4抗体単独の直接的な結合は癌細胞の成長に影響を及ぼさないことを示した結果である。

【図19】実施例12により4B4抗体単独の直接的な結合は癌細胞の成長に影響を及ぼさないことを示した結果である。 10

【図20】実施例13により27B6抗体と放射線治療の併用効果を示した結果である。

【図21】実施例14により選択されたクローン(phage displayed scFv)のCA-XIIに対する結合力(affinity)をELISAでテストした試験結果を示す。

【図22】実施例14により選択された10個のクローン(クローン番号#1、2、8、11、15、19、22、25、26および30)の軽鎖可変領域(VL)の配列とCDR1およびCDR2の配列を示す。

【図23】実施例14により選択された10個のクローン(クローン番号#1、2、8、11、15、19、22、25、26および30)の全長IgGの親和度試験結果を示すグラフである。 20

【図24】実施例14により選択された10個のクローン(クローン番号#1、2、8、11、15、19、22、25、26および30)の全長IgGの親和度試験結果を示すグラフである。

【図25】実施例15によるヒト化抗体DNP004のCA-XII陽性三重陰性乳癌細胞株MDAMB-231における結合の確認を示すものである。

【図26】実施例16により抗体候補群のSDS-PAGEを用いた物性を分析した結果を示す写真である。

【図27】実施例16により抗体候補群のCA-XII陽性細胞株との結合力評価を示す。 30

【図28】実施例17により多様な乳癌細胞におけるDNP004ヒト化抗体のcarbonic anhydrase 12抗原に対する結合様相を確認した結果である。

【図29】実施例17により多様な乳癌細胞におけるDNP004ヒト化抗体のcarbonic anhydrase 12抗原に対する結合様相を確認した結果である。

【図30】実施例18によりDNP004ヒト化抗体の乳癌細胞株における抗体依存性細胞毒性効果を確認した結果を示す。

【図31】実施例18によりDNP004ヒト化抗体の肺癌細胞株における抗体依存性細胞毒性効果を確認した結果を示す。

【図32】実施例18によりDNP004ヒト化抗体の肝癌細胞株における抗体依存性細胞毒性効果を確認した結果を示す。 40

【図33】実施例18によりDNP004ヒト化抗体の胃癌細胞株における抗体依存性細胞毒性効果を確認した結果を示す。

【図34】実施例19によりDNP004ヒト化抗体の三重陰性乳癌マウスモデルにおける抗腫瘍効果を確認した結果を示す。

【図35】実施例19によりDNP004ヒト化抗体の三重陰性乳癌マウスモデルにおける抗腫瘍効果を確認した結果を示す。

【図36】実施例19によりDNP004ヒト化抗体の腎臓癌細胞株マウス動物モデルにおける抗腫瘍効果を確認した結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0086】 50

下記の例示的な実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、本発明の保護範囲が下記の実施例に限定される意図ではない。

【0087】

＜実施例1＞抗CA-XII単クローン抗体（27B6）の製造

CA-XIIに特異的な新たな抗体を開発するために次の実験を行い、開発抗体は、肺腺癌だけでなく、乳癌と大腸癌および前立腺癌においても一部発現し、固形癌特異的な抗体で27B6および4B4と名付けることとした。

【0088】

1-1：27B6単クローン抗体作製のためのターゲット部位の設計

固形癌細胞特異的な抗体を作製するために、固形癌細胞を直接マウスに免疫し、これに対する単クローン抗体を細胞融合方法で確立した。その後、固形癌細胞特異的な単クローン抗体と結合する抗原を分析して同定した。

【0089】

1-2：マウスの免疫化

固形癌で発現する特異的な抗原に対する単クローン抗体を開発するために、肺腺癌細胞株のA549を免疫化した後、流細胞測定器を用いたハイブリドーマ選別過程により、A549細胞に陽性反応を示しながら正常肺細胞株のL132に陰性反応を示す抗体クローンを選んで選別した。単クローン抗体に対する陽性細胞のパーセントは、実験対象5000個の細胞の中からDNP004抗体と結合する細胞の数を%で計算して、-（陰性）は陽性細胞数が10%未満、+は陽性細胞数が10～30%の範囲、++は陽性細胞数が30～70%の範囲であり、+++は陽性細胞数が70～100%に指定した。

固形癌特異的な単クローン抗体を開発するために、6週齢のBalb/c雌マウス1匹あたり、肺腺癌細胞株のA549（ATCC CCL-185）を 1×10^7 の数だけマウス腹腔（IP；intraperitoneal cavity）に3週間の間隔で3回注入し、静脈から血液検体を取って血清を分離した。前記分離された血清にA549細胞に希釈した血清を入れて、4℃で30分間反応させた後、PBS 3mlを入れて1500rpmで3分間遠心分離して、結合しない抗体を水洗し、結合した抗体を確認するために、二次抗体のgoat anti-Mouse Ig-FITC（Dinona）を200倍希釈して入れた後、4℃で15分間反応させた後、PBS 3mlで前記と同様の方法で水洗した後、流細胞分析器で測定してA549細胞株に対する力価を確認した。A549細胞に対する力価を流細胞分析器で確認した結果、A549細胞を免疫化した血清でA549細胞株に対する陽性が高くなったことを確認した（結果未記載）。具体的には、細胞融合を実施する3日前に50ug anti-CA-XII アゴニスト mAbを入れて免疫反応を増加させ、A549（ATCC CCL-185）を 1×10^7 の数だけ注入して、A549表面抗原に対する抗体が増幅されるように誘導した。

【0090】

1-3：ハイブリドーマ細胞の製造

前記のように免疫化されたマウスの脾臓を切除して単一細胞浮遊液を得てRPMI（GIBCO）で2回程度洗浄した後、0.4% trypan blue（sigma）を1：1（v/v）で混合した後、顕微鏡で染色されない細胞を測定するトリパンブルー（trypan blue）染色法で細胞数を計数した。細胞融合partner細胞としてはX63 mouse myeloma細胞株（ATCC CRL-1580）を使用し、前記脾臓細胞と同一に洗浄後に細胞数を計数した。

前記骨髓（myeloma）細胞と脾臓細胞は1：5の比率で混合し、遠心分離後に上澄液を除去した。予め37℃に予熱された50%PEG（polyethylene glycol）1500 1mlを1分かけて徐々に添加した。約1分程度停滞させてからRPMI培地を徐々に追加して段階的に希釈した。これを遠心分離した後、1xHATが含まれているRPMI（20% FBS、hypoxanthine-aminopterin-thymidine）に浮遊させ、96-ウェルプレートに150ul/ウェルで分注した後、37℃、5%CO₂培養器で培養した。前記融合後、一定期間HAT fe

10

20

30

40

50

edingを進行させ、群落を形成したウェルが観察されると、HT培地を150ul添加して、37℃、5%CO₂培養器で48時間培養後、3カラー蛍光染色を実行し、流細胞測定器で分析した。それぞれ異なる波長の染色剤で染色した肺腺癌細胞株のA549細胞と正常肺細胞株のL132はそれぞれ蛍光染色剤で染色後に1:1で混合して準備した後、準備された細胞にハイブリドーマ培養上層液を100ulずつ入れて、4℃で30分間反応させた後、PBS3mlを入れて1500rpmで3分間遠心分離して、結合しない抗体を水洗し、結合した抗体を確認するために、二次抗体のgoat anti-Mouse Ig-A PC (Dinona)を200倍希釈して入れた後、4℃で15分間反応させた後、PBS3mlで前記と同様の方法で水洗した後、流細胞分析器で測定した。

末梢血液に対する結合程度を確認するために、PBMC (peripheral blood mononuclear cells、赤十字血液院)にハイブリドーマ上層液を100ul入れて、4℃で30分間反応させた後、PBS3mlを入れて1500rpmで3分間遠心分離して、結合しない抗体をwashingし、結合した抗体を確認するために、二次抗体のgoat anti-Mouse Ig-FITC (Dinona)を200倍希釈して入れた後、4℃で15分間反応させた後、PBS3mlで前記と同様の方法でwashingした後、流細胞分析器で測定し、その結果を記載した(図1)。図1は、肺腺癌特異的な27B6単クローン抗体の末梢血液での反応度検査の結果を示す。

前記方法において、肺癌細胞株のA549に陽性でかつ正常肺細胞株のL132と末梢血液の顆粒球 (granulocytes) とリンパ球 (lymphocytes) および単核細胞 (monocytes) にすべて陰性の単クローン抗体 (以下、27B6と名付ける) を選別し、最終的に制限希釈 (limiting dilution) により単一コロニーの27B6ハイブリドーマ細胞を確保した。

前記27B6抗体を生産するハイブリドーマ細胞株は、大韓民国、ソウル市、鍾路区、蓮建洞28所在のソウル大学癌研究所韓国細胞株研究財団に2012年2月14日付で寄託し、2012年2月20日付で受託番号KCLRF-BP-00280を与えられた。

【0091】

1-4: 27B6単クローン抗体のアイソタイプ (isotype) の決定

<実施例1-3>で製造された27B6単クローン抗体のアイソタイプを決定するために、mouse immunoglobulin isotyping ELISA kit (BD Biosciences、USA) で分析した。具体的には、isotypingは、rabbit anti-murine isotype specific antisera (IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgA、Kappa、Lambda) を用い、secondary antibodyは、peroxidase-labeled goat anti-mouse IgGを使用した。発色反応は、ortho-phenylenediamine (OPD) とhydrogen peroxide substrateを用いて誘導し、450nmの吸光度を測定して値を確認した。

前記実験の結果、27B6単クローン抗体は、mouse IgG1/kappa light chainで確認された(結果未記載)。

【0092】

1-5: 27B6抗体CDR配列

抗体クローニング過程は図1に示した。具体的には、27B6抗体遺伝子は、Mouse Ig-Primer Set (Millipore、Cat. #: 69831) を用いてクローニングした。27B6ハイブリドーマから分離したRNAからMouse Ig-Primer Setを用いてPCRを行い、これをpGem-Tベクター (Promega、Cat. #: A3600) に挿入した後、シーケンシングによりDNA塩基配列を確認し、IMGT site (www.imgt.org) を通してマウス抗体遺伝子を確認した。

27B6 Ab gene CDR sequenceの重鎖可変領域および軽鎖可変

領域配列をSEQ ID NO: 12および13に示し、重鎖可変領域のCDR1～CDR3はそれぞれ配列番号6～8に示し、軽鎖可変領域のCDR1～CDR3はそれぞれ配列番号9～11に示した（前記表2参照）。

【0093】

＜実施例2＞27B6 chimeric antibodyの製造

マウス起源の単クローン抗体を治療目的で人体に投与する場合、人体の免疫体系は種（species）が異なるため、この単クローン抗体を外来抗原として認知してヒト抗マウス抗体（human anti-mouse antibody；HAMA）反応を起こして血液内のマウス抗体を速やかに除去し、さらに、マウス抗体のFc部分が人体内で効果的な生物学的機能を行えないなど治療効果が急減し、同時に、激しいアレルギー反応および腎臓機能の低下などの副作用が伴う。したがって、人体投与時、27B6抗体の免疫原性を低減するために、可変領域（variable region）を除いた残りの部分をヒトのIgG1のFcに代替したキメラ抗体を作製した後、抗原特異性および親和度が本来のマウス由来27B6抗体と類似していることを確認した。

キメラ抗体を開発するために前述した方法で製造された27B6-HuIgFc DNAをCHO細胞由来のDHFR DG44細胞株に形質転換後、選択培地で選択培養過程を経て27B6組換え抗体を発現する安定化細胞株（stable cell line）を開発した。詳しい実験方法は以下の通りである。

まず、DG44細胞株（Invitrogen、Cat No. A1100001）を形質転換する3時間前に、6ウェルプレートに 1×10^6 cells/mlの濃度で接種し、GIBCO（商標名）CD DG44 medium（Invitrogen、USA）1mlを入れて、37℃、5%CO₂条件で3時間培養後、前記で製造された27B6-HuIgFc DNAをEffectene transfection reagentキット（QIAGEN、Hilden、Germany）を用いて、準備されたDG44細胞に形質転換した。

前記形質転換して3日後、上層液を取ってA549細胞に入れて、4℃で30分間反応させた後、PBS 3mlを入れて1500rpmで3分間遠心分離して、結合しない抗体を水洗し、結合した抗体を確認するために、二次抗体のgoat anti-Human Ig-FITC（Dinona）を150倍希釈して入れた後、4℃で15分間反応させた後、PBS 3mlで前記と同様の方法で水洗した後、流細胞分析器で測定してA549細胞株に対する力価を確認した。この後、安定した細胞株を作るために、30nM MTX（Sigma、USA）と200ug/mlのG418（Invitrogen、USA）を添加したPowerCHO（LONZA、Switzerland）培地に切り替え後、クローン選択過程を開始した。MTXとG418が含まれている培地での選択過程は、MTXとG418の添加濃度を漸進的に高めるものの、各濃度別の選択過程期間は3週に固定した。最終的に選択過程を終えた細胞株は、1000NM MTXと400ug/ml G418が添加されたPower CHO培地で適応過程を終えた状態で選別過程を仕上げ、選別過程の進行後、最終的な細胞株を確立するために、制限希釈（limiting dilution）を実施して単一コロニー（single colony）を確保した。

前述した方法通りに開発した27B6キメラ抗体の抗原特異性および親和度を流細胞測定器を用いて確認した結果、抗原特異性および親和度が本来のマウス由来27B6抗体と類似していることを確認した（図2）。図2は、27B6キメラ抗体の抗原特異性および親和度を確認した結果を示す。

【0094】

＜実施例3＞抗CA-XII単クローン抗体（4B4）の製造

3-1：27B6ペア抗体の開発

同一抗原に結合するものの他のエピトープを認知する抗体を追加的に確保するために、27B6ペアリング抗体を開発した。まず、27B6ペアリング抗体の開発の可能性を評価するために、キメリック27B6とマウス血清を用いてサンドイッチELISAを実現

した。

前記実施例<1-2>に記述された方法と同様に、ヒト肺腺癌細胞株A549 1×10^7 細胞を6週齢雌マウスの腹腔に3週間隔で免疫し、血清を取った。

具体的には、キメリック27B6精製抗体を100 ng/mLの濃度でmicroplateに入れて、37℃で1時間コーティングした。27B6がコーティングされたmicroplateにblocking buffer (sigma)を200 μ L/wellに入れて、37℃で1時間遮断した。A549細胞を1%NP40 lysis bufferを用いて 1×10^7 cells/mLの濃度のlysateを準備した。準備されたA549 lysateを50 μ L/wellでmicroplateに入れて、37℃の温度で1時間反応した後、PBSで3回水洗した。A549免疫で確保したマウス血清1000倍希釈液100 μ L/wellをmicroplateに入れて、37℃で1時間反応した後、PBSで3回水洗した。最後に、二次抗体goat anti-mouse IgG-HRP (Jackson) 2000希釈液を100 μ L/wellに入れて、37℃で30分反応した後、PBSで3回水洗した。TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine)を50 μ L/wellで入れた後、常温で10分間反応して発色を誘導し、2N H_2SO_4 (Sigma)を同量入れて発色反応を終了した。この後、450 nmの波長における吸光値を測定した。

予想した通り、27B6とマウス血清で実現したサンドELISA (sandwich ELISA) で陽性反応を確認することができた。

【0095】

3-2: 単クローン抗体の製造

前記のように免疫化されたマウスの脾臓を切除してハイブリドーマを生産する方法は、<実施例1-3>に記載の方法と同様に進行させた。

前記方法において、肺癌細胞株のA549に陽性でかつ正常肺細胞株のL132と末梢血液の顆粒球 (granulocytes) とリンパ球 (lymphocytes) および単核細胞 (monocytes) にすべて陰性の単クローン抗体27B6とペアの単クローン抗体 (以下、4B4と名付ける) を選別し、最終的に制限希釈 (limiting dilution) により単一コロニーの4B4ハイブリドーマ細胞を確保した (図3)。図3は、4B4抗体の抗原反応度のスクリーニングを示す。前記4B4抗体を生産するハイブリドーマ細胞株は、大韓民国、ソウル市、鍾路区、蓮建洞28所在のソウル大学癌研究所韓国細胞株研究財団に2012年2月14日付で寄託し、2012年2月20日付で受託番号KCLRF-BP-00279を与えられた。

【0096】

3-3: 4B4抗体の分析

前記<実施例1-5>と実質的に同様の方法で抗体のCDRアミノ酸配列を分析した。前記<実施例3-2>で得られた4B4抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域配列をSEQ ID NO: 20および21に示し、重鎖可変領域のCDR1~CDR3はそれぞれ配列番号14~16に示し、軽鎖可変領域のCDR1~CDR3はそれぞれ配列番号17~19に示した (前記表2参照)。

【0097】

<実施例4> 4B4キメラ抗体の製造

前記<実施例2>で記述したように、人体投与時、4B4抗体の免疫原性を低減するために、可変領域 (variable region) を除いた残りの部分をヒトのIgG1のFcに代替したキメラ抗体を作製した後、抗原特異性および親和度が本来のマウス由来4B4抗体と類似していることを確認した。

4B4キメラ抗体の製造方法は、<実施例2>と同様の方法で行い、その結果、開発した4B4キメラ抗体の抗原特異性および親和度を流細胞測定器を用いて確認した結果、抗原特異性および親和度が本来のマウス由来4B4抗体と類似していることを確認した (図4)。図4は、4B4キメラ抗体の抗原特異性および親和度を示す。

【0098】

<実施例5>多様な細胞株における抗体発現の分析

5-1: 多様な細胞株における抗体発現

KCLB (Korean Cell Line Bank) と SNU (Seoul National University) を通して確保した多様な癌細胞株における実施例2および実施例4でそれぞれ得られたキメリック27B6抗体とキメリック4B4抗体の結合の有無を流細胞分析器 (flow cytometry) で確認した。

具体的には、癌細胞株は、KCLB (Korean Cell Line Bank) と SNU (Seoul National University) を通して得ており、L-132、SW-900、DU145、LNCap、MCF-7、Huh7、Hs-578Tは10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS; GIBCO, invitrogen) が添加されたDubco's MEM (GIBCO, invitrogen) 培地を、A549、NCI-H460、NCI-H417、DLD-1、HCT116、HT-29、SW-480、SW-620、LS174T、PC-3、SNU1、SNU638、SNU719、MKN1、MKN28、MKN45、MKN74、NCI-N87、SK-BR3、MDA-MB231、MDA-MB453は10% heat inactivated FBSが添加されたRPMI1640 (GIBCO, invitrogen) 培地を用いて、37℃で5% CO₂ 状態の培養器を用いて培養した。また、Calu-3、Hep3B、SK-HEP-1、C3A、Hep G2、PLC/PRF/5、BT-20は10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS; GIBCO, invitrogen) が添加されたEagle's MEM (GIBCO, invitrogen) 培地を、KATO IIIは20% heat inactivated fetal bovine serum (FBS; GIBCO, invitrogen) が添加されたIMDM (GIBCO, invitrogen) 培地を、SW480、MDA-MB468は10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS; GIBCO, invitrogen) が添加されたLeibovitz's L-15 Mediumを用いて、37℃で5% CO₂ 状態の培養器を用いて培養した。

前記培養された癌細胞株に本発明の27B6、4B4単クローン抗体をそれぞれ入れて、4℃で30分間反応させた後、PBSで水洗し、FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (Dinona Inc, Korea) を入れて、4℃で15分間培養した。再びPBSで水洗した後、FACS caliber (Becton Dickinson, USA) で分析して、その結果を以下に記載した。(表5) 多様な固形癌細胞株における27B6および4B4抗体の反応を確認した。

下記表5は、多様な固形癌細胞株におけるcarbonic anhydrase 12抗原に対する発現様相を示す。表16で、実験対象5000個の細胞の中から27B6および4B4単クローン抗体に対する陽性細胞のパーセントはFACS分析法で分析し、-は陽性細胞数が10%未満、+は陽性細胞数が10~30%の範囲、++は陽性細胞数が30~70%の範囲であり、+++は陽性細胞数が70~100%を示し、-で表された10%未満の陽性細胞数を陰性と見て、それ以上の細胞はすべて陽性と判断する。

【0099】

【表 5】

Origin	Cell line	27B6	4B4
Lung	A549	+++	+++
	NC1-H460	++	++
Colon	HCT116	+	-
	HT-29	+	+
	LS174T	+++	+++
Prostate	LNCap	+	+
Gastric	SNU 719	+	++
	MKN 45	+	+++
Liver	Huh-7	-	++
	Hep3B	-	+
	PLC/PRF/5	+++	+++
Breast	MCF-7	+	+
	SK-BR3	+++	+++
	MDAMB231	+++	+++
	MDAMB453	+++	++
	BT20	+	-
PBMC	Lymphocyte	-	-
	Monocyte	-	-
	Granulocyte	-	-

Cell binding profiling of 4B4 chimeric antibody performed by flow cytometry.

- : less than 10% of positive cells

+ : 10 ~ 30%

++ : 30 ~ 70%

+++ : more than 70%

【0100】

前記表 5 に記載したように、本発明の 27B6 および 4B4 単クローン抗体は、多様な種類の肺腺癌、大腸癌、胃癌、肝癌および乳癌細胞株における結合程度の差は見られるが、陽性反応を示すことを確認した。反面、末梢血液由来リンパ球と単核球、顆粒球にはすべて陰性の反応を確認した。これは、本発明の 27B6 および 4B4 抗体が CA XII 抗原を発現する固形癌に対する治療剤として使用できることを示したものである。

【0101】

5-2 : 多様なタイプの乳癌細胞における発現様相

27B6 と 4B4 は、ER、PR だけでなく、HER2 陽性乳癌細胞においてもすべて陽性反応を示す。したがって、三重陰性乳癌 (Triple negative breast cancer) だけでなく、多様なタイプの乳癌においても治療剤として使用可能である。したがって、3つの互いに異なる表現型の乳癌細胞株における 27B6 と 4B4 単クローン抗体の結合の有無を流細胞分析器 (flow cytometry) で確認した。

MCF-7 細胞 (乳癌細胞株、ER positive cell line) は 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS ; GIBCO, invitrogen) が添加された Dubco's MEM (GIBCO, invitrogen) 培地を、MDA-MB231 (悪性乳癌由来細胞株)、SK-BR-3 細胞 (human breast cancer cell line that overexpresses the Her2 (Neu/ErbB-2) gene product) は 10% heat inactivated FBS が添加された

RPMI 1640 (GIBCO、invitrogen) 培地を用いて、37℃で5% CO₂ 状態の培養器を用いて培養した。

前記培養された乳癌細胞株に本発明の27B6、4B4単クローン抗体をそれぞれ入れて、4℃で30分間反応させた後、PBSで水洗し、FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (Dinona Inc、Korea) を入れて、4℃で15分間培養した。再びPBSで水洗した後、FACS caliber (Beckton Dickinson、USA) で分析して、その結果を表6に記載した。

【0102】

【表6】

Origin	Cell line	Subtype	Immunoprofile	4B4 Expression
Breast	MCF-7	Luminal	ER+, PR+, HER2-	+++
	SK-BR3	HER2	ER-, PR-, HER2+	++
	MDAMB453	Basal	ER-, PR-HER2-	+++
	MDAMB231	Basal	ER-, PR-HER2-	+++
	MDAMB468	Basal	ER-, PR-HER2-	+
	HS578T	Basal	ER-, PR-HER2-	+
	BT20	Basal	ER-, PR-HER2-	-

【0103】

したがって、本発明による27B6と4B4抗体は、ER、PRだけでなく、HER2陽性乳癌細胞においてもすべて陽性反応を示すので、三重陰性乳癌 (Triple negative breast cancer) だけでなく、多様なタイプの乳癌においても治療剤として使用可能である。

【0104】

5-3: IHC (Immunohistochemistry)

人体の正常組織で27B6と4B4単クローン抗体の結合抗原の分布は免疫組織化学染色 (Immunohistochemistry、IHC) 法で確認した。人体の正常胸腺と扁桃組織は忠北大学病院で得ており、忠北大学病院病理課で凍結切片を作製した。

前記作製された凍結切片組織に本発明の27B6、4B4単クローン抗体の免疫組織化学染色は次の通りである。-20℃以下で保管された胸腺と扁桃凍結切片組織を常温で30~60分間乾燥し、1x PBSに60分間浸漬しておいた。次に、3%過酸化水素 (H₂O₂) に常温で10分間反応して内在性ペルオキシダーゼ (peroxidase) の活性を抑制した後、流れる水に水洗し、ヤギ由来免疫グロブリンが含まれている血清で組織を覆い、常温で30分間反応させてマウス抗体による非特異染色を除去した。次に、一次抗体 (27B6、4B4) を常温で60分間反応させた。使用された抗体の濃度はそれぞれ10ug/mlである。次に、5分間3回1x PBSで水洗した後、HRP-conjugated goat anti-mouse抗体 (Dako、Denmark) を入れて、常温で30分間反応後、5分間3回1x PBST (0.05% Tween 20、1x PBS) で水洗した。Diaminobenzidine (DAB) で発色し、流れる水に5分間水洗した後、Hematoxylinで対照染色をし、流れる水に7分間水洗した。染色を終えたスライドは脱水と封入をした後、染色結果は顕微鏡で分析し、以下に記載した。

【表 7】

Tissue		27B6	4B4
Thymus	Cortex	—	—
	Medulla	—	—
Tonsil	Inter follicular T cell	—	—
	B cell	—	—
	Geminal center	—	—
	Basal layer	Basal layer +	

【0105】

10

前記表 7 に記載したように、本発明の 27B6 および 4B4 単クローン抗体が認知する抗原は、正常胸腺と扁桃組織には分布しておらず、特に正常成熟、未成熟 T 細胞と B 細胞で発現しないことを確認した。27B6 抗体の場合、扁桃の basal layer に弱く染色されたが、これは非特異結合の結果として把握される。

【0106】

＜実施例 6＞単クローン抗体に対する抗原分析

6-1: 4B4 および 27B6 単クローン抗原の分離精製

4B4 および 27B6 単クローン抗体の開発に使用された肺腺癌 A549 細胞株を 1×10^8 培養して lysis buffer (1% Nonidet P-40; NP-40 in 50mM Tris-HCl, pH7.4, 50mM EDTA, and 1mM phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride; PMSF) 50ml に懸濁した後、常温で 15 分間溶解させた後、遠心分離により細胞残存物を除去し、上層液を集めて溶解物を準備した。準備された溶解物は 4B4 および 27B6 抗体が認知する抗原分離材料として使用された。

20

精製された 4B4 および 27B6 単クローン抗体 5mg を結合バッファー (0.2M sodium bicarbonate, 0.5M sodium chloride, pH8.3) に透析して 2 種の抗体溶液を製造した。NHS-Activated sepharose 4 Fast Flow resin (GE Healthcare) 2ml を 5ml column にパッキングし、1mM HCl 20ml を流して洗浄した後、再び結合バッファー (20mM sodium bicarbonate, 0.5M sodium chloride, pH8.3) 20ml で水洗して、前記で準備された抗体がよく結合するようにカラム (column) を準備した。準備されたカラム出口 (column outlet) を塞ぎ、準備された 2 種の抗体溶液をそれぞれのカラム (column) に入れた後、カラム入口 (column inlet) を塞いで、常温で 4 時間反応した。Resin と反応して結合しない余分の抗体を除去するために水洗バッファー (20mM Sodium acetate, 0.5M Sodium chloride, pH5.4) 20ml を流してカラム (column) を洗浄し、Resin に残存する反応基を除去するために blocking buffer (0.1M ethanolamine, 0.5M sodium chloride, pH8.3) 50ml を流した。準備された 2 種のカラム (column) は保全バッファー (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.02% sodium azide, pH8.0) を 20ml 流した後、使用前まで冷蔵保管した。

30

40

準備された column は FPLC (Acta FPLC) に連結して Resin に結合した抗体が抗原を認知して抗原を分離できるように準備した。肺腺癌 A549 細胞株溶解物は FPLC に連結されたカラムに注入 (loading) され、4B4 および 27B6 単クローン抗体が認知する抗原の原料として使用された。抗原分離する方法は、平衡 (equilibrium)、原料注入 (sample loading)、洗浄 (washing)、2 次洗浄 (second washing)、溶出 (elution) の 4 段階で行われた。平衡および洗浄バッファーは、0.5% Tween-80、20mM Sodium phosphate、150mM sodium chloride p

50

H7. 4であり、平衡には10ml、洗浄には20mlがそれぞれ使用された。溶出バッファー (elution buffer) は、0.3M Glycine、0.1M sucrose、0.1M Mannitol、1.0M urea、0.5% Tween-80、pH3.0溶液20mlが使用された。2次洗浄溶液 (second washing) は、溶出バッファーを洗浄バッファーに25%の比率で混合した混合液を使用した。抗原分離過程で得られた溶出液 (eluted solution) 20mlにTCA5mlを添加して30分間冷蔵保管し、この後、遠心分離して沈殿物を得て、アセトンで2回追加洗浄した。最終的に得られた沈殿物は1X SDS-PAGE Sample bufferに懸濁して電気泳動を行い、コマジ染色を実施した。前述のように、4B4および27B6抗体でそれぞれ作製したカラムで最終分離精製された抗原は図6の通りである。図6で、4B4および27B6単クローン抗体で作製したカラムで肺腺癌A549細胞株溶解物からそれぞれの抗原を分離精製して得られた試料を電気泳動で確認した結果である。

10

【0107】

6-2: 4B4および27B6単クローン抗原の同定

4B4および27B6単クローン抗体を結合させて作製したresinで分離精製された抗原は図7のように確認された。矢印で表された約58kDaの主要タンパク質バンド2種はソウル医薬研究所に同定依頼された。同定はIn-Gel digestionでペプチドを準備し、LC-MS/MSで分析して得られた結果をPLGS (Waters) とMASCOT (Matrix Science) でプロセッシングして完了した。一連

20

の分析方法は次の通りである。
Gel状態のタンパク質は100%ACN (Acetonitrile) で脱水し、Speedvacを用いて完全に乾燥した。乾燥した状態でトリプシン (trypsin) を添加して15分間digestionした。試料は60%ACN、0.1%TFAで抽出してSpeedvacで濃縮した。試料を5%CAN、0.2%TFA (Trifluoroacetic acid) 溶液20ulに溶かしてLC-MS/MSで分析した。LC columnはnanoACQUITY UPLC BEH C18 (1.7μm、300Å、2.1mm×150mm I.D.) が使用され、移動相バッファーA (0.1%TFA in 100%DW) を移動相バッファーB (0.1%TFA in 100%ACN) に漸進的切り替え方法 (gradient elution) を用いてペプチドを分離した。MS検出器はESI positive、Surver sacn modeを使用した。この後、得られた結果はPLGSおよびMASCOTでプロセッシングした。前記のような一連の分析で下記表のような最終同定結果を取得して、下記表8に示した。

30

【0108】

【表 8】

抗体	No.	Description	mW (Da)	pI (pH)
4B4	1	Actin cytoplasmic 1	41739	5.15
4B4	2	Carbonic anhydrase 12	39426	6.79
4B4	3	Keratin type I cytoskeletal 9	62026	4.96
4B4	4	Serum albumin	68647	5.68
4B4	5	Trypsin	24393	6.91
4B4	6	Actin 3	41813	5.01
4B4	7	Actin 1	41648	5.24
27B6	1	Carbonic anhydrase12	39426	6.79
27B6	2	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	58470	7.96
27B6	3	Actin cytoskeletal 1	41814	5.24
27B6	4	Retinal dehydrogenase 1	42327	5.08
27B6	5	Hemoglobin subunit beta 1	15830	7.5
27B6	6	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	42122	5.88
27B6	7	Protein disulfide isomerase	57146	5.98
27B6	8	Serum albumin	68647	5.68
27B6	9	Trypsin	24393	6.91
27B6	10	Actin gamma	41580	5.33

【0109】

分析された結果のうち、Carbonic anhydrase 12 は、期待した通り、4B4 および 27B6 単クローン抗体で精製した抗原で共通して同定され、細胞表面に存在するタンパク質として知られていることを確認した。その他のタンパク質は細胞内部に存在するタンパク質であるため、4B4 と 27B6 単クローン抗体の抗原になれず、不完全な分離精製過程で含まれている不純物として把握される。

27B6 から分離されたペプチド配列は、QFLLTNNGHSVK (配列番号 22)、WTYFGPDGENSWSK (配列番号 23)、GQEAFVPGFNIEELPER (配列番号 24) および YKGQEAFVPGFNIEELPER (配列番号 25) の 4 種であり、4B4 から分離されたペプチド配列は、QFLLTNNGHSVK (配列番号 22)、EMINNFR (配列番号 26)、GVIYKPA TK (配列番号 27) の 3 種である。このうち、QFLLTNNGHSVK 配列は、4B4 および 27B6 で共通して分析された。図 8 は、Carbonic anhydrase 12 precursor isoform 1 のアミノ酸配列であり、太い文字で分析されたペプチド配列を表示した。図 8 は、分離精製された抗原を LC-MS/MS で分析して同定されたタンパク質リストである。表 9 は、実施例 6 により Carbonic anhydrase 12 isoform 1 のタンパク質配列に、LC-MS/MS で検出された抗原ペプチド断片に基づいて分析した結果、27B6 および 4B4 抗体が認知する抗原が Carbonic anhydrase 12 isoform 1 であることを表示したものである。

【0110】

【表 9】

CA12 isoform 1	MPRRSLHAAAVLLLVLKEQPSSPAPVNGSKWTYFGPDGENS WSKKYPSCGGLLQSPIDLHSDILQYDASLTPLFQGYNLSANKQ FLLTNNGHHSVKNLPSDMHIQGLQSRYSATQLHLHWGNPND PHGSEHTVSGQHFAAELHIVHYNNDLYPDASTASNKSEGLAVL AVLIEMGSFNPSYDKIFSHLQHVKYKGQEAFFVPGFNIEELLPER TAEYYRYRGSLLTPPCNPTVLWTVFRNPVQISQEQLLALETALYC THMDDPSPREMINNFRQVQKFDERLVYTSFSQVQVCTAAGLS LGIIISLALAGILGICTVWVSIWLFRRKSIKKGDNKGVIYKPATKM ETEAHA	
4B4 認知抗原 ペプチド断片配列	QFLLTNNGHSVK	EMINNFR GVIYKPATK
27B6 認知抗原 ペプチド断片配列	QFLLTNNGHSVK	WTYFGPDGENSWSK YKGQEAFFVPGFNIEELLPER GQEAFFVPGFNIEELLPER

10

20

【0111】

6-3: 4B4および27B6単クローン抗原の検定 (ELISA)

LC-MS/MSで得られた抗原同定の結果を検定するために、組換えタンパク質 Carbonic anhydrase 12 (R&D systems) に対する4B4および27B6単クローン抗体の反応性をELISAおよびWestern blotting assayで確認した。

Maxisorp ELISA plateにwellあたり組換えタンパク質 CA XIIを100ng入れて、37℃で1時間反応させて抗原をコーティングした後、1x blocking 溶液 (sigma) をwellあたり200ul入れて、37℃で1時間反応させてブロッキングした。前記準備されたプレートに4B4、27B6、抗CA XII単クローン抗体 (R&D Systems) およびPBS100ulを入れた後、37℃で1時間反応させ、PBSで水洗して結合しない抗体は除去した。その後、Goat anti-Mouse IgG-HRP (Jackson) を希釈して入れて30分間反応させた後、PBSで水洗した後、TMB溶液をwellあたり50ulずつ入れて10分間反応させた後、硫酸50ulを入れて反応を中止させ、450nmにおける吸光度を測定した。組換えタンパク質 Carbonic anhydrase 12に対して27B6単クローン抗体の反応性はやや低いものの、4B4、27B6、anti-CA XII単クローン抗体 (R&D systems) がいずれも図7のような反応性を示した。

30

図7は、4B4および27B6単クローン抗体に対する抗原が Carbonic anhydrase 12であることをELISA assayで検証した結果である。

40

【0112】

6-4: 4B4および27B6単クローン抗原の検定 (western blotting)

前記実験から、4B4および27B6単クローン抗体が Carbonic anhydrase 12を抗原として認知することを示したが、western blottingでもう一度検定した。組換えタンパク質 Carbonic anhydrase 12を3分間沸かした後、8% separating sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelにloadingして電気泳動を実施した。これをニトロセルロース膜にelectrophoretic transferさ

50

せた後、5% skim milk (sigma) 溶液でブロッキングし、それぞれ4B4、27B6、抗-CA XII単クローン抗体(R&D Systems)を結合させた後(27B6:1、2 lane、4B4:3、4 lane、抗-CA XII単クローン抗体:5、6 lane)、洗浄バッファー(0.1% tween-20 in PBS)で2回洗浄した後、peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma, Saint Louis, USA)を結合させた。前記ニトロセルロース膜を洗浄バッファーで洗浄した後、enhanced chemiluminescence detection system (ECL, Amersham, Sweden)でバンドを確認して、その結果を図8に記載した。図8は、4B4および27B6単クローン抗体に対する抗原がCarbonic anhydrase 12であることをWestern blotting assayで検証した結果である。4B4、27B6、Anti-CA XII単クローン抗体(R&D Systems)がすべて40kDaに達する組換えCA XIIに対する反応性を示した。

10

【0113】

6-5: 4B4および27B6単クローン抗原の検定 (Sandwich ELISA)

前記ELISAとWBで4B4および27B6単クローン抗体がCarbonic anhydrase 12を抗原として認知することを証明したが、相対的に27B6単クローン抗体は相対的に反応性が低い。これを補完するために、Sandwich ELISAを下記のように行った。Maxisorp ELISA plateにwellあたりchimeric 4B4またはchimeric 27B6単クローン抗体をwellあたり100ng入れて、37℃で1時間反応させて抗体をコーティングした後、1x blocking solution (sigma)をwellあたり200ul入れて、37℃で1時間反応させてブロッキングした。組換えタンパク質Carbonic anhydrase 12を100ng/mlから2倍ずつ希釈してそれぞれのwellに入れて、37℃で1時間反応させた後、PBSで水洗して結合しない抗原を除去した。この後、chimeric 27B6がコーティングされたwellには4B4単クローン抗体を、Chimeric 4B4がコーティングされたwellには27B6単クローン抗体をwellあたり100ngを入れて、37℃で1時間反応させた後、PBSで水洗して結合しない抗体を除去した。この後、Goat anti-Mouse IgG-HRP (Jackson)を希釈して入れて30分反応させた後、PBSで水洗した後、TMB溶液をwellあたり50ulずつ入れて10分間反応させた後、硫酸50ulを入れて反応を中止させ、450nmにおける吸光度を測定した。コーティング抗体 (Capture antibody)としてChimeric 27B6を用い、検出抗体 (Detector antibody)として4B4を用いた時、組換えタンパク質Carbonic anhydrase 12に対する高い反応性が表10のように確認された。したがって、4B4および27B6単クローン抗体ともCarbonic anhydrase 12を抗原として認知することを証明した。

20

30

下記表10は、27B6および4B4単クローン抗体をCapture/Detector抗体に組み合わせてSandwich ELISA assayで実現し、Carbonic anhydrase 12を27B6と4B4単クローン抗体が同時に認知していることを検証した結果である。

40

【0114】

【表 10】

Capture antibody	Chimeric 27B6	Chimeric 4B4
Detector antibody	4B4 mAb	27B6 mAb
CA12 100ng/ml	1.653	0.021
CA12 50ng/ml	1.349	0.016
CA12 25ng/ml	0.954	0.016
CA12 12.5ng/ml	0.634	0.011
CA12 6.25ng/ml	0.351	0.009
CA12 3.13ng/ml	0.193	0.008
blank	0.064	0.007
blank	0.055	0.008

10

【0115】

＜実施例 7＞エピトープ mapping

エピトープ（エピトープ）を検証するために、図 13 に記載したように、下記の実施で決定されたエピトープ部位を含むか、含まない組換え抗原を作製して、実施例 1 および 3 でそれぞれ得られたマウス 27B6 単クローン抗体および 4B4 単クローン抗体に対する免疫反応を実施した。

20

【0116】

7-1: CA XII mutant 組換え遺伝子の製造および発現

pSec-Tag-CA XII full-hFc 組換え遺伝子を用いて制限酵素 BamHI と HindIII を用いて CA-XII mutant 組換え遺伝子を作った。CA-XII 抗原の全体塩基配列と hFc が結合した遺伝子を pSec-Tag に挿入することによって CA-XII 全体発現 hFc 融合タンパク質を製造し、図 13 のように、N 末端からアミノ酸 300 番目までの deletion mutant-hFc を製造した。

前記 CA XII full-hFc および 5 種の deletion mutant-hFc が挿入された pSec-Tag ベクターを ViaFect (Promega 社) を用いて CHO 細胞に挿入することによって形質転換した。より具体的には、前記各遺伝子および ViaFect complex を前日にプレーティングして新しい培地に入れ替えた CHO 細胞に散布し、48 時間培養した。前記形質感染して 2 日後に培養上澄液を収穫して human Fc (hFc) を検出する sandwich ELISA を用いて発現の有無を確認した。

30

【0117】

7-2: 単クローン抗体のエピトープ（エピトープ）の検証

本発明の単クローン抗体の CA-XII に対するエピトープを検証するために、anti-human Ig 抗体 (Jackson Laboratory 社) を well あたり 50 ng 入れて、37℃ で 1 時間反応させて capture 抗体としてコーティングし、1x blocking 溶液 (sigma) をウェルあたり 200 ul 入れて、37℃ で 1 時間反応させてブロッキングした。前記準備されたプレートに製造された CA XII full-hFc および 5 種の deletion mutant-hFc の培養上層液をウェルあたり 100 ul ずつ入れた後、37℃ で 1 時間反応させ、PBS で水洗して結合しない抗体は除去した。これに anti-mouse Ig、Fc specific-HRP (Jackson Laboratory 社) を希釈して入れて 30 分間反応させた後、PBS で水洗した後、TMB 溶液をウェルあたり 50 ul ずつ入れて 10 分間反応させた後、硫酸 50 ul を入れて反応を中止させ、450 nm における吸光度を測定した。前記培養上層液に CA XII mutant-hFc タンパク質が存在することを確認するために、対照群として anti-human Ig 抗体を用いて Captur

40

50

e & detect Sandwich ELISAを行い、前記実験の結果を図9に記載した。

図9に示すように、CA-XIIのN-末端から25番目のアミノ酸から57番目のアミノ酸からなる断片であってnon-catalytic domainで確認された。したがって、CA-XIIのcatalytic domainには結合せず、よって、CA-XII酵素活性を阻害しないと見られる。

具体的には、前記実験の結果から、切断方法で確認した27B6抗体の抗原結合部位は、配列番号2のAPVNGSKWTYFGPD（配列番号5の25番目のアミノ酸～38番目のアミノ酸で構成される）であり、CA-XIIの3次元的結晶構造に基づいて再び確認した好ましい抗原結合部位は、配列番号2のアミノ酸配列のうち、7個のアミノ酸で構成された配列番号1のWTYFGPDである（配列番号5の32番目のアミノ酸～38番目のアミノ酸で構成される）。また、前記実験の結果から、切断方法で確認した4B4抗体の抗原結合部位は、配列番号4のGENSWSKKYPSCGGLLQSP（配列番号5の39番目のアミノ酸～57番目のアミノ酸で構成される）であり、CA-XIIの3次元的結晶構造に基づいて再び確認した好ましい抗原結合部位は、配列番号4のアミノ酸配列のうち、14個のアミノ酸で構成された配列番号3のGENSWSKKYPSCGGである（配列番号5の39番目のアミノ酸～52番目のアミノ酸で構成される）。

【0118】

＜実施例8＞固形癌におけるキメラ抗体の治療効果（CDC）

8-1：肺腺癌細胞株におけるCDC効果

肺腺癌細胞株のA549 cellを96ウェル（well）プレートに 5×10^3 cells/wellで分注した後、37℃、CO₂ incubatorで20～24時間培養する。各ウェル（well）の培養培地を除去した後、ウシ胎児血清が含まれないRPMI培地に精製したキメリック27B6抗体を最終濃度10μg/mlとなるように10%のhuman serumを混合して混合液を作った後、各wellに100μlずつ分注した。

キメリック4B4抗体も同様の方法を用いた。37℃、CO₂ incubatorで3hr培養後、Ez-Cytox agent（DOGEN、KOREA）をウェル（well）あたり10μlずつ添加した。37℃、CO₂ incubatorで3hr30分培養後、プレートリーダー（plate reader）を用いてOD450nmにおける吸光度を測定した。その結果を図10に示し、図10は、27B6抗体の補体依存性細胞毒性効果を示す図である。

【0119】

図10に示すように、本発明の実施例2および4でそれぞれ得られたキメリック27B6およびキメリック4B4単クローン抗体が補体依存性細胞毒性を示すことを確認することができた。

【0120】

8-2：三重陰性乳癌におけるCDC効果

前記＜実施例8-1＞と実質的に同様の方法で治療効果を評価するが、ただし、標的細胞としてA549細胞株の代わりに三重陰性乳癌細胞株MDAMB-231を行ってOD450nmにおける吸光度を測定して、下記表11に示した。表11は、実施例8により4B4キメラ抗体が三重陰性乳癌で補体依存性細胞毒性を示すことを確認した結果である。

【表 1 1】

sample	cytotoxicity(%)
No treat	0.0
5% HS	(12.7)
5% NHS+4B4 1ng/ml	76.5
5% NHS+4B4 10ng/ml	86.3
5% NHS+4B4 100ng/ml	83.4
5% NHS+4B4 1000ng/ml	75.7
5% NHS+4B4 10000ng/ml	83.7
4B4+5% NHS+CVF 50ug	83.9
4B4+5% NHS+CVF 100ug	80.7

10

【0 1 2 1】

前記表 1 1 に示すように、本発明の 2 7 B 6 単クローン抗体が肺腺癌で補体依存性細胞毒性作用を示すことを確認することができた。

【0 1 2 2】

<実施例 9> 固形癌におけるキメラ抗体の治療効果 (A D C C)

9-1: 抗体依存性細胞毒性検査 (A D C C-L D H a s s a y)

エフェクター細胞 (e f f e c t o r c e l l) 準備のために、ヒトの血液を採取してフィコール (f i c o l l) 溶液を添加した後 (血液: f i c o l l = 1 : 2)、2 0 0 0 r p m で 2 0 分間遠心分離して P B M C (P e r i p h e r a l B l o o d M o n o n u c l e a r C e l l) を得た。得られた P B M C を 5 % F B S 添加 R P M I 培地で 3 7 ° C で保管した。抗体依存性細胞毒性検査は、L D H a s s a y 方法と L u c i f e r a s e a s s a y 方法を利用して実験した。

20

標的細胞として、多様な固形癌細胞株であって H T 2 9 (大腸癌)、A 5 4 9 (肺腺癌)、N C I - H 4 6 0 (肺腺癌)、M C F 7 (乳癌) 細胞を 1×10^4 c e l l s / w e l l で 9 6 ウェルプレートに準備した後、3 7 ° C、C O ₂ i n c u b a t o r で 1 8 ~ 2 0 時間培養する。各ウェル (w e l l) の培養液をすべて除去した後、5 % ウシ胎児血清が含まれている培養培地にキメリック 2 7 B 6 抗体を 0 μ g / m L、0. 1 μ g / m L、1 3 g / m L となるように添加して準備し、これを培養液を除去したプレートに 1 0 0 u l ずつ分注した後、3 7 ° C のインキュベータで 3 0 分間反応させた。この後、準備されたエフェクター細胞を各 w e l l あたり 5×10^5 (標的細胞の 5 0 倍) となるように入れて、2 4 時間、3 7 ° C の C O ₂ インキュベータで培養した。陽性対照群としては溶解バッファー (l y s i s b u f f e r) を入れて、3 7 ° C で 2 4 時間培養した。2 4 時間培養した後に、2 5 0 0 r p m で 5 分間遠心分離して上層液のみ得た後、標的細胞から溶解して出た L D H (l a c t a t e d e h y d r o g e n a s e) を測定して細胞の溶解程度を計算した (P r o m e g a a s s a y k i t)。その結果、図 1 1 に示すように、本発明の 2 7 B 6 単クローン抗体が多様な固形癌で抗体依存性細胞毒性作用を示すことを確認することができた (図 1 1)。図 1 1 は、2 7 B 6 抗体の抗体依存性細胞毒性効果を確認した結果である。

30

40

【0 1 2 3】

9-2: 三重陰性乳癌における抗体依存性細胞毒性検査 (A D C C-L D H a s s a y)

エフェクター細胞は、前記 9-1 の方法と同様の方法で準備し、抗体依存性細胞毒性検査を行った。

2 7 B 6 抗体は、乳癌の分類のうち、現在治療剤が開発されていない三重陰性乳癌細胞株である M D A M B - 2 3 1、M D A M B - 4 6 8、M D A M B - 4 5 3、B T - 2 0 細胞株で高い抗体依存性細胞毒性作用を示すことを確認することができた (図 1 2)。図 1 2 は、2 7 B 6 抗体の三重陰性乳癌細胞株における抗体依存性細胞毒性効果を確認した結果である。

50

【0124】

<実施例10>固形癌におけるdefucosylationキメラ抗体の治療効果 (ADCC)

10-1: defucosylated Chimeric 27B6 抗体のADCC 効能の確認 (Colon、lung、breast cancer)

抗体タンパク質のdefucosylationを誘導するために、実施例2による27B6と実施例4による4B4キメラ抗体細胞株の培養時、defucosylationを誘導する薬物のkifunensineを100ng/mlで培養液に添加して培養した後、精製してdefucosylationされていない抗体とのADCC効果を比較した。Colon、lung、breast癌で、kifunensine処理ADC

10

C強化chimeric 27B6抗体のADCC効能を確認した。
その結果、図13に示すように、kifunensineを処理してdefucosylationを誘導した抗体を多様な固形癌細胞株に処理した時、抗体依存性細胞毒性が増加することを確認することができた。図13は、Defucosylated 27B6キメラ抗体の抗体依存性細胞毒性の検査結果である。

【0125】

10-2: defucosylated Chimeric 27B6 抗体のADCC 効能の確認—三重陰性乳癌

Luciferase ADCC assay方法を利用して、三重陰性乳癌細胞株のMDAMB231とHER2受容体陽性の乳癌細胞株SK-BR3の抗体依存性細胞毒性効果を調べた時、同じく、kifunensineを処理してdefucosylationを誘導した抗体を処理した時、kifunensineを処理しない抗体より抗体依存性細胞毒性が増加することを確認することができた(図14)。図14は、Luciferase assayを用いたDefucosylated 27B6、4B4キメラ抗体の抗体依存性細胞毒性検査を示す。

20

具体的には、標的細胞として乳癌細胞株のMDAMB231とSK-BR3を96well plateに 1.25×10^4 cells/wellでplating後、37℃のCO₂ incubatorで20~24時間培養する。各ウェル(well)の培養液を除去した後、low IgG FBS4%が含まれているRPMIを細胞のプレティングされているwellに25ulずつ添加する。27B6、4B4抗体を最大10ug/mlで3-foldに希釈して最低約1.2ng/mlまでlow IgG FBS4%が含まれているRPMIを用いて希釈した抗体試料を準備する。準備されたそれぞれの抗体試料を当該wellに25ulずつ添加した後、plateの蓋を閉じてクリーンベンチ内で維持させた。培養していたADCC reporter cell (ADCC Reporter Bioassay, Promega)をharvestした後、low IgG FBS4%が含まれているRPMIで 3×10^6 cells/mlとなるように懸濁する。各wellにADCC reporter cell懸濁液を25ulずつ添加した後、37℃のCO₂ incubatorで24時間培養する。プレートを取り出す前に、予め凍結されているluciferase substrateを湯煎器に溶かして準備しておく。プレートを取り出して室温で15分放置後、luciferase substrateを各wellあたり75ulずつ添加した後、暗室で30分間反応させた後、luminometerを用いて発光度を測定した。前記Luciferase assayを用いたDefucosylated 27B6、4B4キメラ抗体の抗体依存性細胞毒性検査の結果を図14に示した。

30

40

図14に示すように、kifunensineを処理してdefucosylationを誘導したキメリック27B6または4B4抗体をMDAMB231、SK-BR-3それぞれに処理した時、抗体依存性細胞毒性が増加することを確認した。

【0126】

<実施例11>マウス実験モデルにおける27B6、4B4抗体の治療効果

11-1: 細胞株の確立

50

ヒトの乳癌動物モデルは、三重陰性乳癌 (triple negative breast cancer) 細胞株のMDA-MB-231とMDA-MB-453細胞株に確立した。まず、MDA-MB-231とMDA-MB-453細胞を 1.5×10^8 (in RPMI: Matrigel mixture) で準備した後、マウスの右脇腹に皮下接種し、対照群、試験群としてランダム割り当てる。

図15は、動物実験に用いたMDA-MB231細胞に対する実施例2のキメリック27B6、実施例4のキメリック4B4抗体の細胞表面結合を追加確認したものであり、図16は、これを用いた動物実験に関する結果であって、抗体投与によってMDA-MB231細胞株により生成された癌の成長が阻害されて大きさが減少する結果である。

試験物質は、27B6 fucoseキメラ抗体、27B6 defucoseキメラ抗体、4B4 fucoseキメラ抗体4B4 defucoseキメラ抗体であり、乳癌細胞を接種して3日後からマウス1匹あたり12mg/kgの用量を腹腔内に投与した。試験物質の投与回数は週2回投与で3週間投与し、腫瘍の大きさを週2回治療剤投与前に測定する。Anti-CA XII antibodiesの乳癌に対する有効性は、次の式 $(a \times b) / 2$ 、(aは短径、bは長径)で計算して体積に換算された結果で比較する。実施例20-1の体積の計算式と同一である。

[数式]

体積計算式 (体積 = $(a \times b) / 2$ 、aは短径、bは長径)

【0127】

11-2: 三重陰性乳癌に対する抗CA-XII antibodiesの有効性評価

三重陰性乳癌特異発現するCA-XIIエピトープを標的として三重陰性乳癌に対するキメリック4B4抗体の有効性を評価した(図17)。

4B4を投与した乳癌の体積が抑制されることを確認し、fucose抗体よりdefucose抗体の方が成長抑制効能に優れていた。4B4 defucosylation抗体の乳癌の成長抑制効能は、MDA-MB-231とMDA-MB-453の両腫瘍から確認され、特に、MDA-MB-453モデルの場合、21日目から腫瘍がそれ以上成長しない完全寛解状態を示した(図17)。図17は、三重陰性乳癌に対する4B4抗体の有効性の結果である。

【0128】

<実施例12> 抗体投与による細胞生存への影響の確認

実施例4のキメリック4B4抗体を用いて細胞の生存に及ぼす影響を確認した。抗原CA-XII陽性癌細胞に抗体投与時、細胞の成長および生存に影響を及ぼすかを確認するために、96ウェルのflat bottom plateにcellを 3×10^4 cells/wellで前日分注した(10% RPMI)。24hr後にRPMI除去し、抗体を含む体積が100ulとなるように新しい5% RPMIを分注した。24時間後、Cytotox96 (商標名) Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (Promega, Cat. #G1780)をwellあたり50ulずつ分注し、30分間RTで反応した後、spectrophotometerで細胞の活性度を測定した。MDA-MB231細胞に抗体投与後、24時間経過後の細胞活性度を測定した。

前記測定結果を図18に示し、抗体投与による細胞活性度の促進または阻害現象は現れておらず、CA-XII酵素の阻害はなく腫瘍細胞の成長に無影響であることを示す。したがって、本発明による抗体は、免疫システムによるADCC、CDCで抗腫瘍活性を示した。

A549に抗体投与後、24時間、48時間、72時間経過後の細胞活性度を測定した。抗体を投与しない場合に比較して、細胞活性度の変化が大きく現れなかった。図18および図19は、4B4抗体単独の直接的な結合は癌細胞の成長に影響を及ぼさないことを示した結果である。

抗CA-XII抗体としてキメリック4B4抗体自体の細胞結合だけでは細胞の成長に影響を及ぼさなかった。このような理由は、キメリック4B4抗体の場合、CA-XII

抗原のN-末端非酵素部位(N-terminal non-enzymatic region)に結合するので、CA-XII酵素の活性には影響を及ぼさないためと見られる。

【0129】

＜実施例13＞抗体およびRadiotherapyの併用による治療効果評価

本発明による抗体と放射線療法を共に処理する場合に抗癌効果が増大するかを確認した。

具体的には、本発明による実施例2のキメリック27B6抗体と共に、それぞれcisplatin 5ug/ml処理、2Gy放射線照射、または4Gy放射線照射を行った後に、A549細胞におけるCA-XII発現程度の変化を流細胞分析器で確認した。その結果、cisplatin処理および放射線照射後にCA-XII抗原の細胞表面の発現が増加することが確認され、放射線4Gy照射時に最も高い発現様相を示した。これは、放射線照射と本発明によるCA-XII抗体の併用投与で癌細胞の成長抑制に影響を及ぼしうるとの可能性を提起する(図20の上のグラフ)。

そこで、併用処理に対する癌細胞死滅効果を検証するために、図20の下グラフのように、27B6抗体と放射線照射を併用処理した後、A549癌細胞株の細胞死滅効果をMTT assayで測定した。図20の下グラフは、27B6抗体と放射線治療の併用効果を示した結果である。図20に示すように、抗体単独処理または抗体に対する陰性対照群としてisotype control抗体と放射線照射併用処理と比較して、27B6と放射線照射併用処理時、高い比率で癌細胞を死滅させる結果を確認した。

【0130】

＜実施例14＞抗-CA-XIIキメラ抗体のヒト化

14-1：ヒト化可変ドメインの構築(DNP004 scFv formの選択)

＜実施例4＞で得られたfull IgG形態の4B4キメラ抗体を鋳型としてDHラボ所有Phage display技術でantibody screeningのためにscFv形態に転換した。このために、キメリック4B4抗体のvariable regionをE. coli codonに切り替えてVLとVHをPCRで連結してscFv geneを作製した。VLとVHの順序およびlinkerの長さを組み合わせて多様なconstructsを作製した後、phagemid vectorにligationした。ligationしたplasmid vectorは、抗原のCA-XIIと結合能力分析により結合能力が最も高いDNP004 scFvのVH-long linker-VL形態を選択してmutagenesis templateに使用した。

【0131】

14-2：サブライブラリーの作製およびスクリーニング

DHラボ社のノウハウにより、variable region全体または部分に対してrandom mutation sublibraryまたはposition specific mutation sublibraryを計11種作製した。作製されたSublibraryの種類は次の通りである：

(1) Random mutation sublibrary：VL1種、VH1種、VH&VL2種

【0132】

(2) Position specific mutation sublibrary：LCDR3種、HCDR3種、VH&VL1種

前記作製した11種のサブライブラリーを対象にCA-XIIに対するbio-panningを行った。1次スクリーニングによりVL部分にsignalの高いclone 552個を選定した後、2次スクリーニングによりmother cloneのsignalより高いclone 78個を選別した。この後、塩基配列を確認して塩基配列が互いに異なる計32個のcloneを選別した。

選定された32個のcloneをELISA方法でCA-XIIに対する結合能力を再確

認して、ELISA signalが、mother cloneの4B4キメラ抗体と対比して1.5倍以上のclone 10種(clone ID 1、2、4、5、8、15、24、25、26、28)を選定し、これらのCDRの配列分析の結果、LCDR1およびLCDR2部分に変異があることを確認した(図22)。

その後、LCDR1およびLCDR2部分をhot-spotで判断して、前記10種(clone ID: 1、2、4、5、8、15、24、25、26、28)、そして追加的にLCDR2部分に変異がある4種(clone ID: 11、22、19、30)を選別してfull IgG転換[LK sun、P Curtis、Chimeric antibody with human constant regions and mouse variable regions directed against st carcinoma-associated antigen17-1A、Proc Natl Acad Sci USA. 1987 Jan; 84(1): 214-8]をした(図21および図22)。しかし、full IgGに転換したクローン14種のうち、Low expressionなどの理由からclone ID: 4、5、24、および28は後の物質テスト実験で除外した。前記10種の選択されたクローンの変異部位を下記表12にまとめる。

【0133】

【表12】

クローンID	Sub-library		Mutation position
	random	selected	
#1	0		VL-CDR1, VL-CDR2
#2	0		VL-CDR2
#4	0		VL-FR1
#5		0	VL-CDR1, VL-CDR2
#8		0	VL-CDR2
#15		0	VL-CDR2
#24		0	VL-CDR2
#25	0		VL-CDR2
#26	0		VL-CDR1, VL-FR1
#28		0	VL-FR1

【0134】

14-3: ヒト化ライブラリーの形質感染およびIgGの培養および測定

CHO細胞を96ウェルプレートに接種し、ヒト化クローンのミニプレップDNAで形質感染させた。詳しい実験方法は以下の通りである。

まず、CHO細胞株を形質転換する12時間前に6-ウェルプレートに 1×10^5 Cells/mlの濃度で接種し、5%ウシ胎児血清が含まれているDMEM 3mlを入れて、37℃、5%CO₂条件で12時間培養後、前記で製造された10種のFull IgG DNAをViaFect reagentキット(Promega、USA)を用いて、準備されたCHO細胞に形質転換した。細胞培養物上層液を形質感染48時間後に収集し、各ヒト化クローンおよび対照群のIgG抗体の反応性をELISAで確認した。

Maxisorp ELISA plateにwellあたり組換えタンパク質CA XIIを100ng入れて、37℃で1時間反応させて抗原をコーティングした後、1x blocking溶液(sigma)をwellあたり200ul入れて、37℃で1時間反応させてブロッキングした。前記準備されたプレートに4B4、27B6、抗CA XII単クローン抗体(R&D Systems)およびPBS 100ulを入れた後、37℃で1時間反応させ、PBSで水洗して結合しない抗体は除去した。この後、Goat anti-Human IgG-HRP(Jackson)を希釈して入れて30分間反応させた後、PBSで水洗した後、TMB溶液をwellあたり50ulずつ入れて10分間反応させた後、硫酸50ulを入れて反応を中止させ、450nmにおける吸

光度を測定した。

【0135】

14-4: ELISAを用いたヒト化抗体候補群の抗原親和力テスト

抗原CA-XIIにヒト化クロンの結合をDHラボから提供されたプロトコルおよび抗原を用いて平行試験した。活性（親和力）を各クローンに対して計算し、同一のプレート上で陽性対照群（キメラクロン4B4）の活性と比較した。10種のvariants（clone ID1、2、4、5、8、15、24、25、26、28）の抗原結合力は、mother clone（4B4キメリック）に比べて大して高くないことが確認されたが、ELISA上で予想されるmother cloneのaffinityは約 $KD10^{-10}$ M水準とされ、これは非常に高い水準で、10種の候補抗体の抗原結合力がmother cloneに届かなくてもその結合力が低いわけではないと判断される（図23および図24）。

10

【0136】

<実施例15> ヒト化抗体CDR配列／抗体sequence

15-1: 抗-DNP004ヒト化抗体遺伝子配列の選定

DNP004ヒト化抗体遺伝子は、CA-XIIに特異的に結合するマウス単クローン抗体4B4（ハイブリドーマ寄託番号：KCLRF-BP-00279）の軽鎖および重鎖可変領域遺伝子を鋳型としてヒト化抗体の作製を進行させるものの、前記DHラボ社のIn silicoノウハウによりvariable region全体または部分に対してrandom mutation sublibraryまたはposition specific mutation sublibraryを計10種を作製した。

20

このように作製されたlibraryを用いて、phage display方法で計552個の個別的なcloneをscreeningして、これらのうちmother cloneより高いsignalを見せたclone78個を選別した。塩基配列確認の結果、計32個の互いに異なるcloneを選別した。32種のCA-XIIに対する結合力を再確認した結果、ELISA signalがmother clone対比1.5倍以上のclone10種が確認され、主にLCDR1、2部分にmutationがあることが確認された。したがって、LCDR1、2部分をhot-spotで判断して10種を選別し、追加的にLCDR2部分にmutationがある4種（11、22、19、30）を選別してfull IgG1転換をした。このように準備されたfull IgG14種のうち、Low expressionなどの理由からclone ID4、5、24、28を除いた10種を発現／精製後、ELISAを進行させて最終的に10種を選別した。

30

最終的には、マウス単クローン抗体4B4と最も類似のヒト化抗体#8番の抗体候補を選定した。各候補抗体は、シーケンシングによりヒト化抗体遺伝子を確認し、分析されたDNP004抗体の重鎖および軽鎖可変領域配列は次の通りである（表13、表14）。下記表13に示すように、重鎖可変領域のCDRは同一であるか一部が異なるが、軽鎖可変領域のCDR配列は異なってもよい。下記の配列番号15、16、28、32～42で濃く表示したアミノ酸は変形したものを示す。

【0137】

40

【表 1 3】

Clone ID no.	CDR1	配列 番号	CDR2	配列 番号	CDR3	配列 番号
V _H -chimeric	GYSYTDYN	14	IDPANGDT	15	ARPIYYGAYWYFDV	16
V _H -humanized	GYSYTDYN	14	IDPANGDT	15	SRPIYYGAYWYFDV	28
V _L -chimeric	KSLLSHNGNTY,	17	RMS	18	MQHLEYPT	19
V _L -humanized 一般式	ASSX ₁ VTY	29	X ₂ TSX ₃ LX ₄ X ₅	30	QQWSSNPLT	31
#1-V _L	ASSPVTY	32	ATSSLAP	34	QQWSSNPLT	31
#2-V _L	ASSSVTY	33	ATSSLVS	35	QQWSSNPLT	31
#8-V _L	ASSSVTY	33	GTSRLVS	36	QQWSSNPLT	31
#11-V _L	ASSSVTY	33	ATSHLVS	37	QQWSSNPLT	31
#15-V _L	ASSSVTY	33	GTSQLVS	38	QQWSSNPLT	31
#19-V _L	ASSSVTY	33	RTSDLIS	39	QQWSSNPLT	31
#22-V _L	ASSSVTY	33	ATSELMs	40	QQWSSNPLT	31
#25-V _L	ASSSVTY	33	GTSMLAS	41	QQWSSNPLT	31
#26-V _L	ASSPVTY	32	ATSSLAS	42	QQWSSNPLT	31
#30-V _L	ASSSVTY	33	ATSSLVS	35	QQWSSNPLT	31

10

【 0 1 3 8】

【表 1 4】

Frame work #1 of V _H -humanized	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	43
Frame work #2 of V _H -humanized	IYWVRQAPGKLEWVG	44
Frame work #3 of V _H -humanized	TYNQKFKGRATISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYC	45
Frame work #4 of V _H -humanized	WGQGTLLTVSS	46
Frame work #1 of V _L -humanized	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR	47
Frame work #3 of V _L -humanized	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	51
Frame work #4 of V _L -humanized	FGQGTKVEIK	52
Frame work #2 of V _L -humanized 一般式	MHWYX ₆ QKPGKAPX ₇ PWIY (X6= Q or H; H7=R or K)	48
#26-V _L	MHWYQQKPGKAPRPWIY	49
#30-V _L	MHWYHQKPGKAPKPWIY	50

20

30

【 0 1 3 9】

下記の表 1 5 で、前記選定されたクローンの重鎖および軽鎖可変領域配列を表示し、いずれも重鎖可変領域は同一であり（配列番号 5 3）、軽鎖可変領域は異なり（配列番号 5 4～6 3）、下線で表示した配列部分が C D R 配列に相当する。

【 0 1 4 0】

40

【表 15】

Clone no.	ID	アミノ酸配列	配列番号
V _H		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYTDYNIYWVRQAPGKGLEWVG ^Y IDPANG DTTYNQKFKGRATISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRPIYYGAYWYFDVWG QGTLVTVSS	53
#1-V _L		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSPVTYMHWYQQKPGKAPKRWIYATSSSLAPG VPSRFGSGSGTDFLTITSSSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK	54
#2-V _L		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVTYMHWYQQKPGKAPKRWIYATSSSLVSG VPSRFGSGSGTDFLTITSSSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK	55
#8-V _L		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVTYMHWYQQKPGKAPKRWIYGTSLVSG VPSRFGSGSGTDFLTITSSSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK	56
#11-V _L		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVTYMHWYQQKPGKAPKRWIYATSHLVSG VPSRFGSGSGTDFLTITSSSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK	57
#15-V _L		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVTYMHWYQQKPGKAPKRWIYGTSQLVSG VPSRFGSGSGTDFLTITSSSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK	58
#19-V _L		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVTYMHWYQQKPGKAPKRWIYRTSDLISG VPSRFGSGSGTDFLTITSSSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK	59
#22-V _L		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVTYMHWYQQKPGKAPKRWIYATSELMMSG VPSRFGSGSGTDFLTITSSSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK	60
#25-V _L		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVTYMHWYQQKPGKAPKRWIYGTSM LASG VPSRFGSGSGTDFLTITSSSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK	61
#26-V _L		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSPVTYMHWYQQKPGKAPRWIYATSSSLASG VPSRFGSGSGTDFLTITSSSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK	62
#30-V _L		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVTYMHWYHQKPGKAPKRWIYATSSSLVSG VPSRFGSGSGTDFLTITSSSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK	63

【0141】

15-2: ヒト化抗体の製造

前記作製された抗-CA-XIIヒト化抗体DNPO04のアミノ酸配列に基づいて、ヒト化抗体を作製した。

抗-CA-XIIヒト化抗体の発現のために、重鎖発現用プラスミドと軽鎖発現用プラスミドをそれぞれ作製した。重鎖発現用プラスミドはp cDNA3.4 (Invitrogen社)ベクターを用い、軽鎖発現用プラスミドはpOptiVEC (Invitrogen社)ベクターを用いた。

追加的なアミノ酸の挿入なしに抗体それぞれの可変領域コーディングcDNAと不変領域コーディングcDNAを連続的なアミノ酸配列として発現させるために、前記クローニングした可変領域のコーディング塩基配列と知られたhuman IgG1不変領域(重鎖)およびkappa不変領域(軽鎖)コーディング塩基配列を連結した遺伝子片それぞれを合成(Bioneer社)した。このように合成した重鎖および軽鎖発現遺伝子は、制限酵素Xho IとSal Iで切断した後、重鎖遺伝子片はp cDNA3.4ベクターに、軽鎖遺伝子片はpOptiVECベクターにそれぞれligationして完全な抗体発現用プラスミドを作製した(p cDNA3.4-4B4の重鎖発現プラスミドおよびpOptiVEC-4B4軽鎖発現プラスミド)。

前記作製されたp cDNA3.4-4B4の重鎖発現プラスミドとpOptiVEC-4B4軽鎖発現プラスミドを、CHO細胞由来のDG44細胞(Invitrogen)にtransfectionさせて形質転換過程を行った。

まず、transfection3日前に浮遊状態のDG44細胞を5% FBSが含まれているMEMa培地に適応させることにより、付着状態の細胞に変換させて形質転換効率を高められるように適応させた。形質転換は、ViaFect transfection

on reagent (Promega、Cat. # : E4981) を用いて 6well plate で行った。形質転換前日、 1×10^5 Cells/well の濃度で継代培養して付着状態で適応された DG44 細胞を準備し、形質転換に使用された DNA の量は、pOptiVEC-4B4 軽鎖発現プラスミドと pcDNA3.4-4B4 重鎖発現プラスミドをそれぞれ 3ug、1ug ずつ 3:1 の比率の組み合わせで使用した。形質転換は 48 時間行った。形質転換された細胞群を分析するために、流細胞分析器 (flow cytometer) を用いた。

図 25 は、ヒト化抗体 DNP004 の CA-XII 陽性三重陰性乳癌細胞株 MDAMB-231 における結合の確認を示すものである。

【0142】

<実施例 16> 抗体候補群の物性評価

ヒト化抗体変異体の発現および物理的特性を比較評価するために、SDS-PAGE 分析、Size exclusion chromatography、Melting temperature、ANS 反応性などを比較評価した。

【0143】

16-1: 抗体候補群-発現量分析

発現量および Protein A の精製による沈澱発生の有無を確認するために、8 種の変異体組換えベクターを HEK293F に導入して一時的な形質転換を誘導した。

それぞれの培養液 300mL を protein A (GE Healthcare、Cat. No. 11-0034-93) に注入し、溶出バッファー (20mM citric buffer pH3.0) を用いて精製した。取得した抗体をリン酸塩緩衝食塩水で透析し、透析前後の定量を実施して損失の有無を確認した。発現量は 1.0~10.0 ug/mL の範囲で非常に多くの差を示し、25、26 番の変異体で高い発現率を確認することができた (表 16)。

【0144】

【表 16】

クローン番号	透析前の発現量 (mg) [単位体積あたりの発現量]	透析後の発現量 (mg)
ヒト化抗体変異体#1	0.6 [2.0 ug/mL]	0.6
ヒト化抗体変異体#2	2.5 [8.33 ug/mL]	2.5
ヒト化抗体変異体#8	1.5 [5.0 ug/mL]	1.2
ヒト化抗体変異体#11	1.5 [5.0 ug/mL]	1.3
ヒト化抗体変異体#15	0.3 [1.0 ug/mL]	0.3
ヒト化抗体変異体#19	1.2 [4.0 ug/mL]	1.0
ヒト化抗体変異体#22	0.5 [1.67 ug/mL]	0.5
ヒト化抗体変異体#25	2.7 [9.0 ug/mL]	2.7
ヒト化抗体変異体#26	3.0 [10.0 ug/mL]	3.0
ヒト化抗体変異体#30	1.5 [5.0 ug/mL]	1.5

【0145】

16-2: 抗体候補群に対する SDS-PAGE 分析

ヒト化抗体変異体の重鎖/軽鎖結合安定性、重鎖および軽鎖の単一性などを評価するために、SDS-PAGE 分析を実施した。

非還元分析条件では抗体 5ug を、還元分析では抗体 10ug を 2X Laemmli sample buffer (BioRead、Cat. No. : 161-0737) に混合した後、100℃で 5 分間沸かし、ini-PROTEAN TGX gel (Bio-Rad、Cat. No. : 456-1083) に試料を load した。150V で 1 時間電気泳動を実施し、SimplyBlue Safestain (Invitrogen、Cat. No. : LC6060) で 2 時間染色し、蒸留水で脱染した。ヒト化抗体変異体 8 種のうち、クローン #15 番の変異体の場合、軽鎖染色が不明確であったが、

それ以外の変異体7種では異常がないことを確認した(図26)。

図26は、抗体候補群のSDS-PAGEを用いた物性を分析した結果を示す写真である。ヒト化抗体変異体8種のうち、15番の変異体の場合、軽鎖染色が不明確であったが、それ以外の変異体7種では異常がないことを確認した(図26)。

【0146】

16-3: 抗体候補群に対するSE-HPLC分析

純度評価のために、Size exclusion-chromatography分析を実施した。

それぞれの抗体をリン酸塩緩衝食塩水で希釈して1.0mg/mL準備し、平衡バッファー(0.1M sodium phosphate、0.1M sodium chloride pH7.0)で平衡化したTSK gel G3000SWXL(TOSOH)に20uL注入した。0.5mL/minの流速で平衡バッファーを40分間流しながら溶出するタンパク質を280nmの波長で検出した。検出されたピークを自動積分で積分してそれぞれのピークに対する面積を計算し、主ピーク的面積比を百分率で記した。

大部分の変異体の主ピーク的面積比は95%以上の純度を示したが、変異体#11、26番の場合、94.3%、94.1%の純度で相対的にやや低く評価された(表17)。

【0147】

【表17】

クローン番号	Retention time(min)	Main peak Area(%)
キメリック抗体(4B4)	15.998	98.3402
ヒト化抗体変異体#1	16.366	95.325
ヒト化抗体変異体#2	16.326	95.0894
ヒト化抗体変異体#8	16.332	95.1814
ヒト化抗体変異体#11	16.409	94.3005
ヒト化抗体変異体#15	16.307	96.8589
ヒト化抗体変異体#19	16.263	97.4621
ヒト化抗体変異体#22	16.158	96.7872
ヒト化抗体変異体#25	16.329	95.3279
ヒト化抗体変異体#26	16.361	94.1417
ヒト化抗体変異体#30	16.326	95.735

【0148】

16-4: 抗体候補群-Melting temperature (Tm) 分析

強固性(robustness)比較評価のために、ヒト化抗体変異体のMelting temperatureを測定した。

抗体変異体0.44ugにProtein thermal shift dyeとbuffer(Invitrogen、Cat. No.: 4462263)を製造会社のマニュアルに従って添加して混合液20uLを製造して、Protein Thermal ShiftTM Software v1.0が搭載されたReal time PCRに注入した。0.05°C/secの速度で25°Cから95°Cまで連続的に温度を増加させながら、Protein thermal shift dyeと抗体との間の結合によって放出される蛍光値を検出した。試験完了後、Viia(商標名)7 SoftwareでBoltzmann fittingを実現し、それぞれの抗体に対するmelting temperature (Tm)を計算した。8番の変異体の場合、Tm71.41°Cで最も強固な抗体として評価された。Tmと純度との間の相関関係を確認するために、それぞれの変異体を62°Cの高温条件で3時間放置した後、Size exclusion chromatography分析を実施し、主ピーク的面積比を計算した。

変異体8番の場合、62°Cの高温条件で最も多くの主ピーク比率を示し、Tm分析値と同じく最も強固な変異体として測定された(表18)。

【0149】

【表18】

クローン番号	Melting temperature (°C)	Main peak Area(%)
ヒト化抗体変異体#2	69.96	89.534
ヒト化抗体変異体#8	71.41	94.684
ヒト化抗体変異体#19	66.93	83.662
ヒト化抗体変異体#22	68.59	NA
ヒト化抗体変異体#30	70.01	88.852

10

【0150】

16-5: CA XII 陽性細胞株の結合力評価

CA XII 抗原を発現するMDAMB231乳癌細胞株10%heat inactivated FBSが添加されたRPMI1640 (GIBCO、invitrogen)で培養した後、Trypsine-EDTA (Invitrogen)で脱着した後、リン酸塩緩衝食塩水を入れて遠心分離して洗浄し、 2×10^6 cells/tubeで分注した。

ヒト化抗体変異体を1.0 μ g/mLの濃度となるようにそれぞれのtubeに入れて、冷蔵で30分反応した。リン酸塩緩衝食塩水を入れて遠心分離して洗浄し、FITC標識二次抗体Goat anti-Mouse IgG (H+L) - FITC (Dinona)を入れて、冷蔵で20分反応した。リン酸塩緩衝食塩水でもう一度遠心分離して洗浄し、1% formaldehydeが添加されたリン酸塩緩衝食塩水で細胞を浮遊して流細胞分析器 (Stratedigm、S1000EXi) で蛍光を分析した。

20

MDAMB231細胞株に結合する4B4キメラ抗体のMean Fluorescence Intensity (MFI)を基準として変異体の結合力を百分率で図27のように示した。すべての変異体がいずれも90%以上の相対的結合力を示し、変異体8、11、15および26番は99%の相対的結合力を示して、キメラ抗体とほとんど差がなかった(図27)。

【0151】

<実施例17>多様な細胞株におけるヒト化抗体の発現分析

30

17-1: 多様な細胞株における抗体の発現

KCLB (Korean Cell Line Bank) とSNU (Seoul National University) により確保した多様な癌細胞株におけるヒト化抗体 (DNP004) の抗体結合の有無を流細胞分析器 (flow cytometry) で確認した。具体的には、癌細胞株はKCLB (Korean Cell Line Bank) とSNU (Seoul National University) を通して得ており、LNCap、MCF-7、Huh7、Hs-578Tは、10%heat inactivated fetal bovine serum (FBS; GIBCO、invitrogen) が添加されたDubco's MEM (GIBCO、invitrogen) 培地を、A549、NCI-H460、DLD-1、HT-29、LS174T、PC-3、SNU638、SNU719、MKN45、NCI-N87、SK-BR3、MDA-MB231、MDA-MB453は10%heat inactivated FBSが添加されたRPMI1640 (GIBCO、invitrogen) 培地を用いて、37°Cで5%CO₂ 状態の培養器を用いて培養した。また、Hep3B、1-7、PLC/PRF/5は10%heat inactivated fetal bovine serum (FBS; GIBCO、invitrogen) が添加されたEagle's MEM (GIBCO、invitrogen) 培地を、KATO IIIは20%heat inactivated fetal bovine serum (FBS; GIBCO、invitrogen) が添加されたIMDM (GIBCO、invitrogen) 培地が添加されたMediumを用いて、37°Cで5%CO₂ 状態

40

50

の培養器を用いて培養した。

前記培養された癌細胞株に本発明のヒト化抗体（DNP004）をそれぞれ入れて4℃で30分間反応させた後、PBSで水洗し、FITC-conjugated goat anti-Human IgG（DiNona Inc、Korea）を入れて、4℃で15分間培養した。再びPBSで水洗した後、FACS caliber（Becton Dickinson、USA）で分析して、その結果を以下に記載した（表19）。下記表19は、多様な固形癌細胞株におけるcarbonic anhydrase 12抗原に対する発現様相を示す。表19で、DNP004陽性細胞のパーセントはFACS分析法で分析し、実験対象5000個の細胞の中からDNP004抗体と結合する細胞の数を%で計算して、－は陽性細胞数が10%未満、＋は陽性細胞数が10～30%の範囲、＋＋は陽性細胞数が30～70%の範囲であり、＋＋＋は陽性細胞数が70～100%に指定した。

【0152】

【表19】

Origin	Cell line	4B4 chimeric	DNP004
Lung	A549 TA	+++	+++
	NCI-H460	++	++
Colon	DLD-1	－	+
	HT-29	+	+++
	LS174T	+++	+++
Gastric	SNU 638	－	+
	SNU719	++	++
	KATO III	－	+++
	MKN 45	+++	+++
Liver	Huh-7	++	+++
	Hep3B. 1-7	+	+
	PLC/PRF/5	+++	+++
Prostate	LNCap	+	－
Kidney	786-0	+++	+++
Breast	MCF-7	+	++
	SK-BR3	+++	++
	MDAMB231	+++	+++
	MDAMB453	++	+++
	Hs-578T	－	++
PBMC	Lymphocyte	－	－
	Monocyte	－	－
	Granulocyte	－	－

前記表19に記載のように、同じoriginの細胞でも、細胞株の構築時、Tissueソースが異なるため、細胞の種類によって陽性反応の程度は差が生じうるが、本発明のヒト化抗体DNP004は、多様な種類の肺腺癌、大腸癌、胃癌、肝癌および乳癌細胞株における結合程度の差は見られるものの陽性反応を示し、前立腺癌では陰性反応を示すことを確認した。反面、末梢血液由来リンパ球と単核球、顆粒球にはすべて陰性の反応を示すことを確認した。このような結果は、本発明のヒト化抗体DNP004が陽性反応を示す固形癌を適応症とする治療剤として使用できることを示したものである。

【0153】

17-2：多様なタイプの乳癌細胞における発現様相

DNP004抗体は、ER、PRだけでなく、HER2 positiveのBreast cancer cellにおいてもすべて陽性反応を示す。したがって、三重陰性

乳癌 (Triple negative breast cancer) だけでなく、多様な種類の乳癌治療剤としても使用可能である。3つの互いに異なる表現型の乳癌細胞株におけるDNP004ヒト化抗体の結合の有無を流細胞分析器 (flow cytometry) で確認し、chimeric 4B4と結合程度の差を比較した。

具体的には、MDAMB-231およびMDAMB453、MCF-7、SK-BR-3細胞株は、前記<実施例5-2>と同様の方法で培養した。前記培養された癌細胞株にDNP004ヒト化抗体をそれぞれ入れて、4℃で30分間反応させた後、PBSで水洗し、FITC-conjugated goat anti-Human IgG (Dinona Inc、Korea)を入れて、4℃で15分間培養した。再びPBSで水洗した後、FACS caliber (Becton Dickinson、USA) で分

10

析して、その結果を図28および図29に記載した。
図28および図29は、多様な種類の乳癌細胞におけるDNP004ヒト化抗体のcarbonic anhydrase 12抗原に対する結合様相を確認した結果である。したがって、本発明によるDNP004ヒト化抗体は、ER、PRだけでなく、HER2陽性乳癌細胞においてもすべて陽性反応を示すので、三重陰性乳癌 (Triple negative breast cancer) だけでなく、多様な種類の乳癌においても治療剤として使用可能である。

【0154】

<実施例18>多様な固形癌に対するヒト化抗体の治療効果 (ADCC)

多様な固形癌における抗体依存性細胞毒性 (ADCC) をLuciferase assayで評価した。標的細胞として乳癌細胞株のMDAMB-231とMDAMB-453、MCF7、SK-BR3、肺癌細胞株のA549、肝癌細胞株のHuh7とHEP3B、胃癌細胞株のKATO III、SNU719、MKN-45を96-well plateに 1.25×10^4 cells/wellでplating後、37℃、CO₂ incubatorで20~24時間培養する。各ウェル (well) の培養液を除去した後、low IgG FBS4%が含まれているRPMIをプレーティングされているwellに25ulずつ添加する。実施例15によるDNP004ヒト化抗体を最大10ug/mlで3-foldに希釈して最低約1.2ng/mlまでlow IgG FBS4%が含まれているRPMIを用いて希釈した抗体試料を準備する。準備されたそれぞれの抗体試料を当該wellに各濃度に合わせて添加した後、plateの蓋を閉じて

20

30

クリーンベンチ内で維持させた。培養していたADCC reporter cell (ADCC Reporter Bi5 assay、Promega) をharvestした後、low IgG FBS4%が含まれているRPMIで 3×10^6 cells/mlとなるように懸濁した。各wellにADCC reporter cell懸濁液を25ulずつ添加した後、37℃、CO₂ incubatorで24時間培養した。

40

プレートを取り出す前に予め凍結されているluciferase substrateを湯煎器に溶かして準備しておく。プレートを取り出して室温で15分放置後、luciferase substrateを各wellあたり75ulずつ添加した後、暗室で30分間反応させた後、luminometerを用いて発光度を測定した。
図30は、DNP004ヒト化抗体の乳癌細胞株における抗体依存性細胞毒性効果の確認結果であり、図31は、DNP004ヒト化抗体の肺癌細胞株A549における抗体依存性細胞毒性効果の確認結果であり、図32は、DNP004ヒト化抗体の肝癌細胞株Huh7とHEP3Bにおける抗体依存性細胞毒性効果の確認結果であり、図33は、DNP004ヒト化抗体の胃癌細胞株KATO III、SNU719、MKN-45における抗体依存性細胞毒性効果の確認結果を示す。

したがって、本発明によるDNP004ヒト化抗体は、DNP004抗原 (CA XI I、Carbonic anhydrase XI I) が発現する多様な種類の固形癌細胞における抗体依存性細胞毒性効果による細胞死滅機序があることを立証した。

【0155】

50

<実施例 19> マウス実験モデルを用いたヒト化抗体の治療効果評価

19-1: 乳癌動物モデル／単一濃度の抗体投与群実験

ヒトの乳癌動物モデルは、三重陰性乳癌 (triple negative breast cancer) 細胞株の MDA-MB-453 細胞株に確立した。まず、 1.5×10^7 細胞数の MDA-MB-453 細胞をマウスの右脇腹に皮下接種し、腫瘍の形成と成長を観察し、腫瘍の大きさは下記の数式によって計算した。

(体積 = $(a \times b) / 2$ 、 a は短径、 b は長径)

腫瘍の大きさが $100 \text{ mm}^3 \pm 20$ に到達した時、マウスをランダムに対照群グループ (5 匹) と処理群グループ (5 匹) に分離し、処置群グループに DNP004 ヒト化抗体は 10 mg/kg の量をマウスの尾静脈に投与した。この後、腫瘍は、実験期間、3～4 日間隔で 1 週間に 2 回測定し、腫瘍成長曲線は抗体投与開始日から実験終了時点までとし、前記結果の平均値を図 34A に示した。したがって、ヒト化抗体投与群は大部分の腫瘍成長が抑制される結果を示した (図 34)。

【0156】

19-2: 乳癌動物モデル／複数の濃度の抗体投与群実験

前記実施例 19-1 と同一の乳癌動物モデルを用いて、DNP004 ヒト化抗体を多様な濃度で投与する実験を進行させた。

具体的には、 4 mg/kg 、 8 mg/kg 、 16 mg/kg 、 32 mg/kg として 4 つの濃度で投与した抗体投与群 (グループ) を各グループあたり 5 匹ずつ実験を進行させた。 16 mg/kg 用量の抗体投与群では部分的な腫瘍抑制効果を示し、全体的に用量と比例的に腫瘍抑制効果を示してはいなかったが、腫瘍成長が完全に抑制される完全寛解 (complete remission) 状態の結果は、抗体投与用量が高いほど、増加する傾向を示した (図 35、表 20)。

【0157】

10

20

【表 20】

MDAMB453(Triple negative breast cancer) Xenograft model		
DNP004 投与 dose 別 Group	mouse#	Mass size(mm ³)
1 (Control)	191	333
	211	429
	190	91
	197	211
	198	143
2 (DNP004 4 mg/kg)	236	161
	210	155
	227	53
	192	0 (complete remission)
	215	0
3 (DNP004 8 mg/kg)	201	213
	214	182
	189	0 (complete remission)
	196	0 (complete remission)
	228	0 (complete remission)
4 (DNP004 16 mg/kg)	224	333
	217	486
	195	0 (complete remission)
	206	135
	205	0 (complete remission)
5 (DNP004 32 mg/kg)	222	0 (complete remission)
	234	175
	209	0 (complete remission)
	200	0 (complete remission)
	188	0 (complete remission)

【0158】

19-3: 腎臓癌動物モデル／単一濃度の抗体投与群実験

ヒト化抗体 (DNP004) のターゲット抗原 (CA-XII) が高く発現する腎臓癌 (Renal cell cancer) 細胞株の786-O細胞を用いて、マウス動物モデルの確立および抗腫瘍効果を確認した (図36)。

具体的には、ヌードマウスに 1.5×10^7 細胞数の786-O細胞株を皮下注射した。しかし、この実験セットの場合、腫瘍形成は前記乳癌細胞株の場合とは異なって非常に遅く行われ、約70日後に腫瘍形成を確認した。前記腫瘍形成が確認された処置群グループにDNP004ヒト化抗体は32mg/kgの量をマウスの尾静脈に投与した。この後、腫瘍は、実験期間、3～4日間隔で1週間に2回測定し、腫瘍成長曲線は抗体投与開始日から実験終了時点までとし、対照群3匹対比、DNP004ヒト化抗体投与群8匹の個別マウスの平均腫瘍成長曲線を図36に示した。

したがって、乳癌だけでなく、腎臓癌においてもDNP004ヒト化抗体の抗癌効果を確認した。

【0159】

【表 2 1】

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEPTION IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1

To: Song, Hyung Geun
1505 15F Mapo Trapalace, Dohwa-Dong, Mapo-Gu, Seoul, Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : 4B4-3-13	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCLRF-BP-00279
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by : ☒ A scientific description ☒ A proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on February 14, 2012	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Director Korean Cell Line Research Foundation Address : Cancer Research Institute Seoul National University College of Medicine 28 Yongon-dong, Chongno-Gu Seoul, 110-744, Korea	Signature(s)  Date : 2012. 02. 20.

【0 1 6 0】

【表 2 2】

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEPTION IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1

To: Song, Hyung Geun
1505 15F Mapo Trapalace, Dohwa-Dong, Mapo-Gu, Seoul, Korea

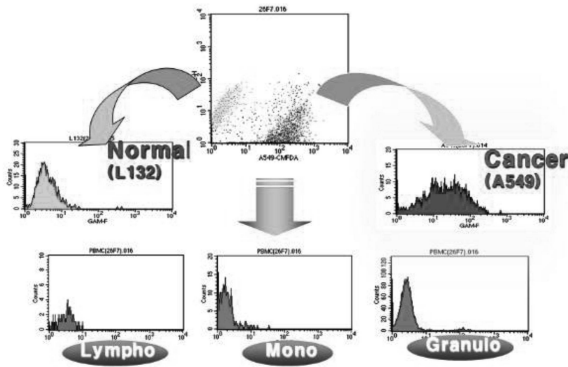
I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : 27B6-4-19	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCLRF-BP-00280
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by : ☒ A scientific description ☒ A proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on February 14, 2012	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Director Korean Cell Line Research Foundation Address : Cancer Research Institute Seoul National University College of Medicine 28 Yongon-dong, Chongno-Gu Seoul, 110-744, Korea	Signature(s)  Date : 2012. 02. 20.

10

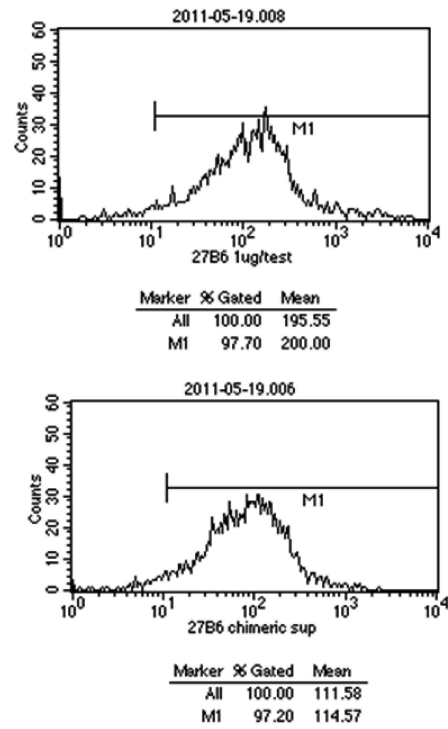
20

30

【図 1】

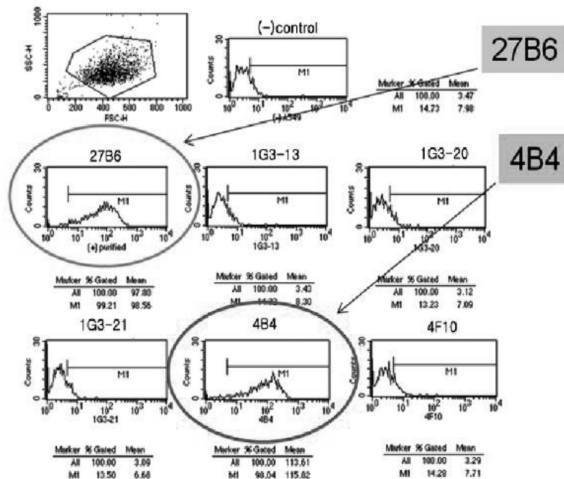


【図 2】

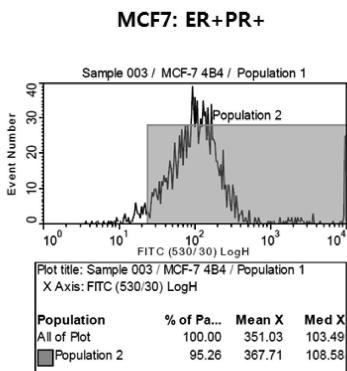


【図 3】

27B6 ペアリング Ab 融合クローン
スクリーニング
Partner cell: A549-SNU

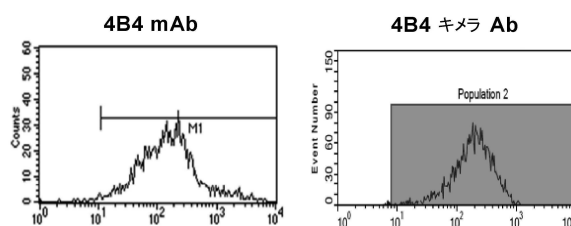


【図 5 A】

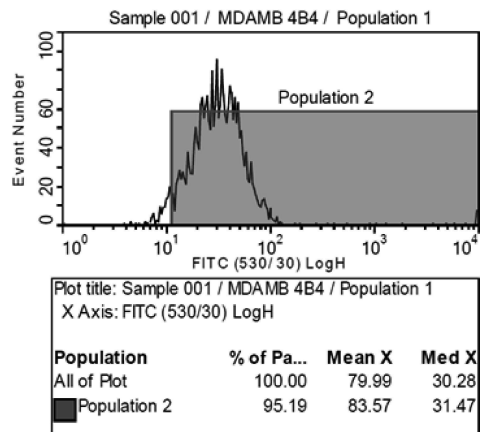


ER: Estrogen receptor
PR: Progesterone Receptor
HER2: human epidermal growth
factor receptor 2

【図 4】

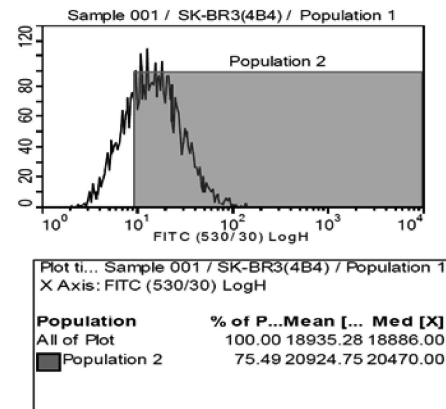


【図 5 B】

MDAMB231: トリプルネガティブ

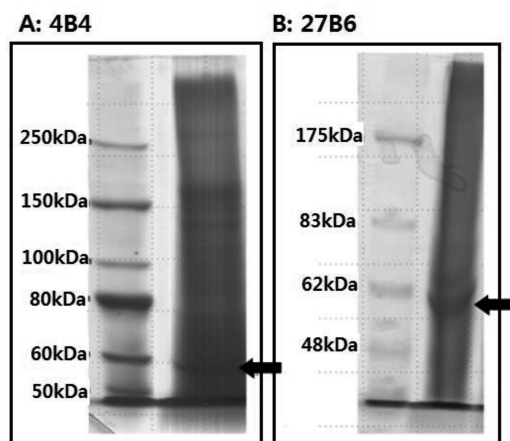
ER: Estrogen receptor
PR: Progesterone Receptor
HER2: human epidermal growth factor receptor 2

【図 5 C】

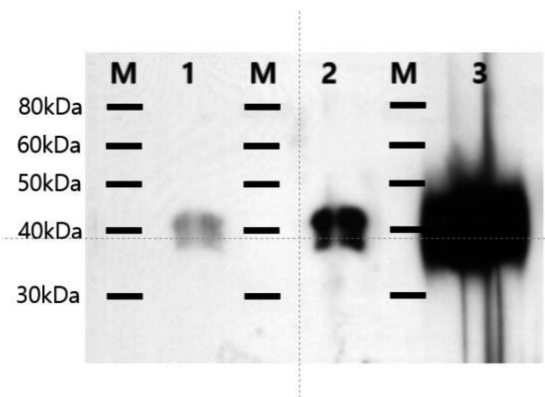
SKBR3: HER2+

ER: Estrogen receptor
PR: Progesterone Receptor
HER2: human epidermal growth factor receptor 2

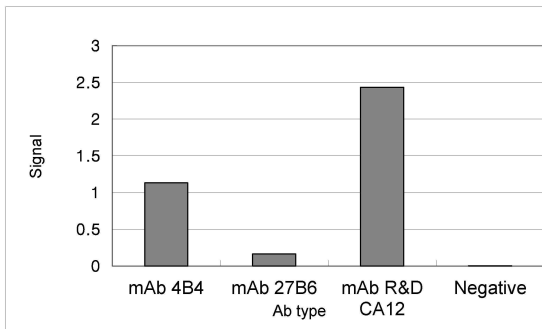
【図 6】



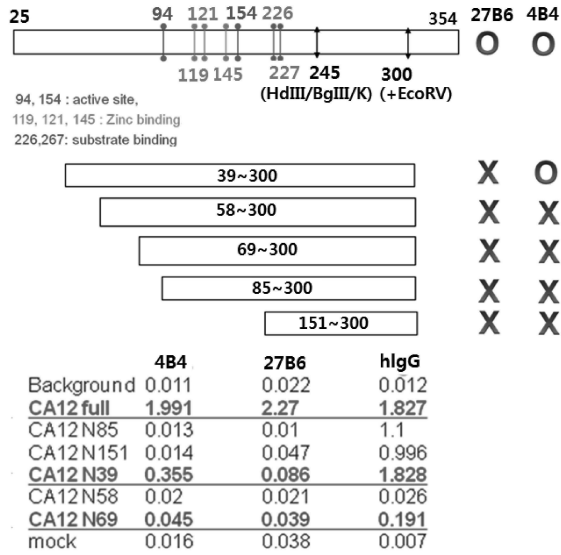
【図 8】



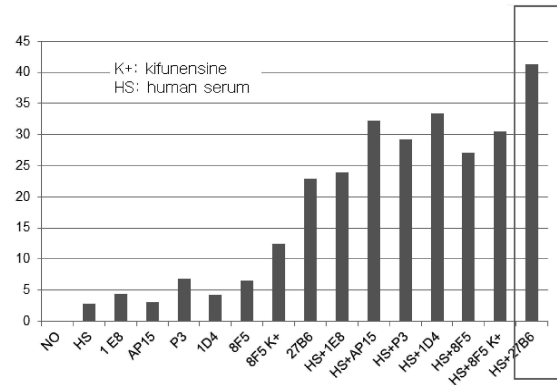
【図 7】



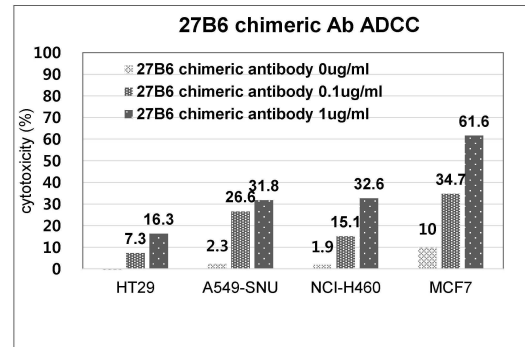
【図 9】



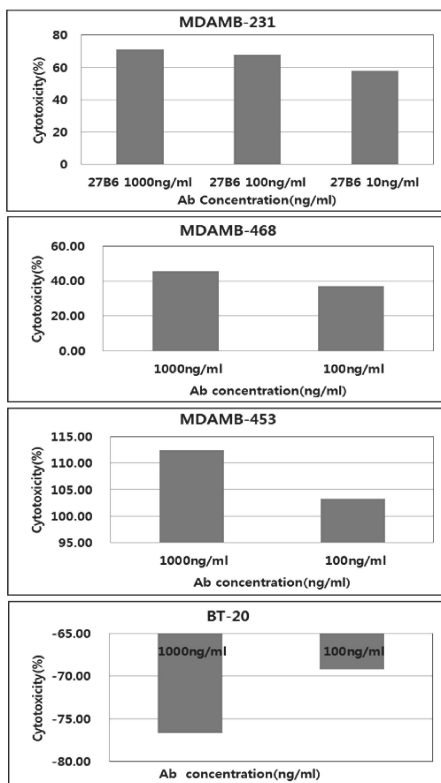
【図 10】



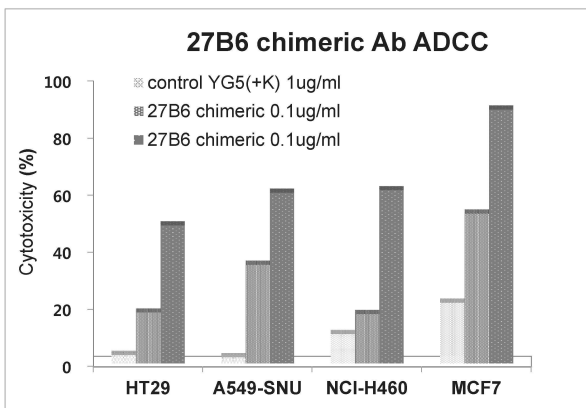
【図 11】



【図 12】

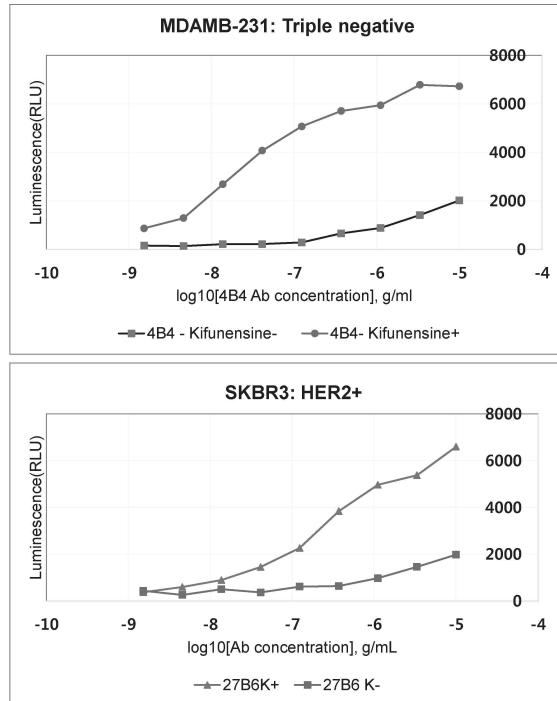


【図 13】



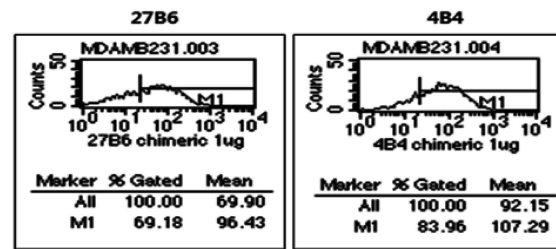
HT29: human colorectal adenocarcinoma
A549: human lung adenocarcinoma
NCI-H460: human non-small cell lung carcinoma
MCF7: human breast adenocarcinoma(ER+/ PR+/ ERBB2-)

【図 14】

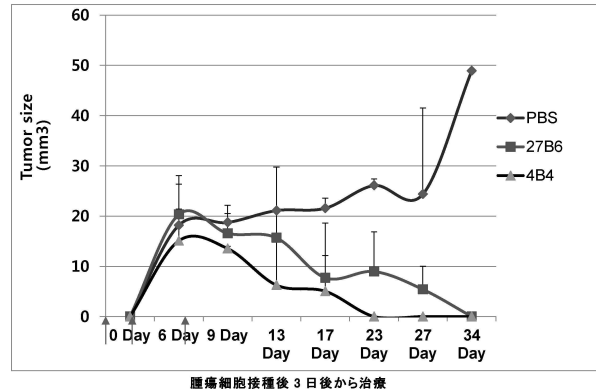


【図 15】

MDA-MB-231 細胞における CA12 発現

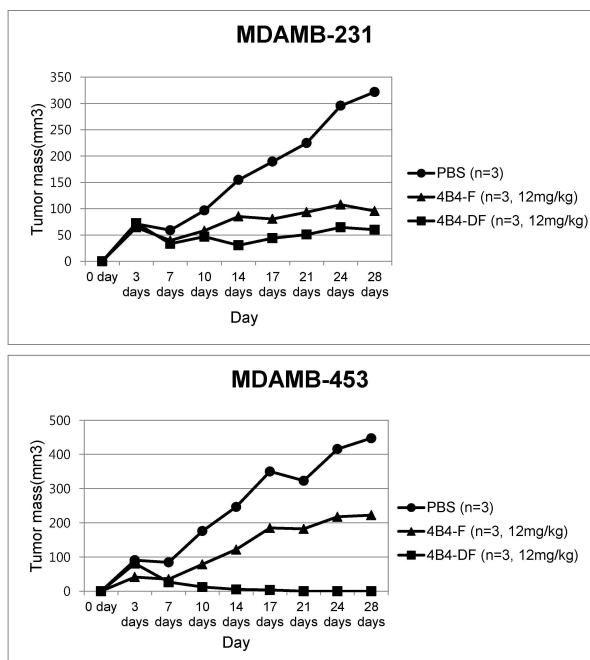


【図 16】

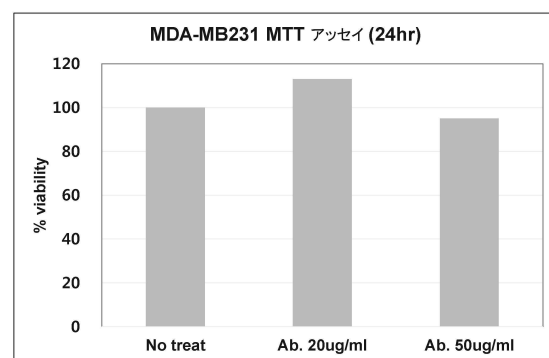


細胞株	MDAMB-231 (TNBC cell line)
接種細胞数	1*10 ⁷
投与部位	S.C.-flank
キメラ抗体	27B6, 4B4
用量／投与時間	12mg/kg, 3 time injection for 2 weeks/ I.P.

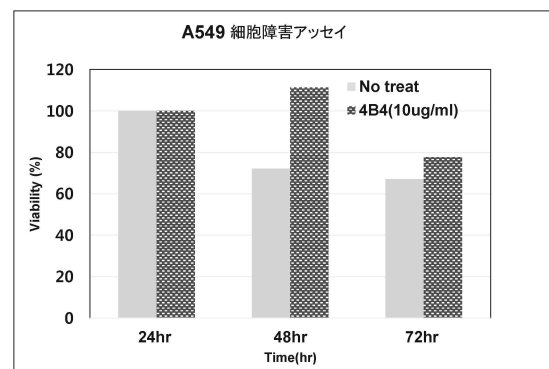
【図 17】



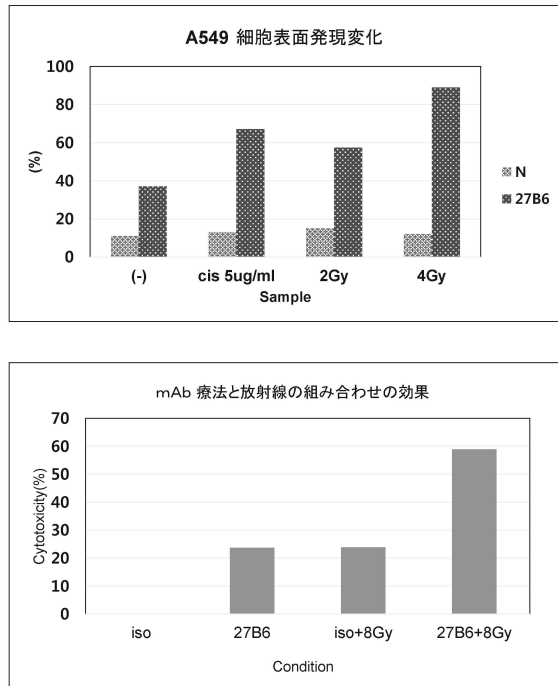
【図 18】



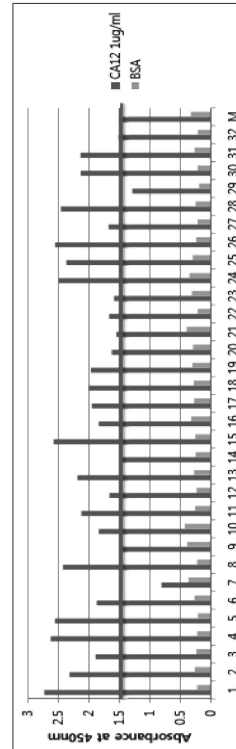
【図 19】



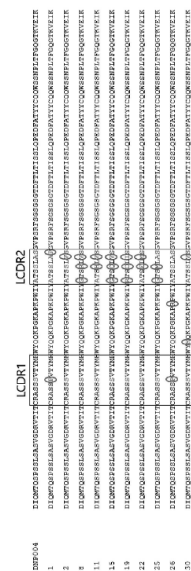
【図 20】



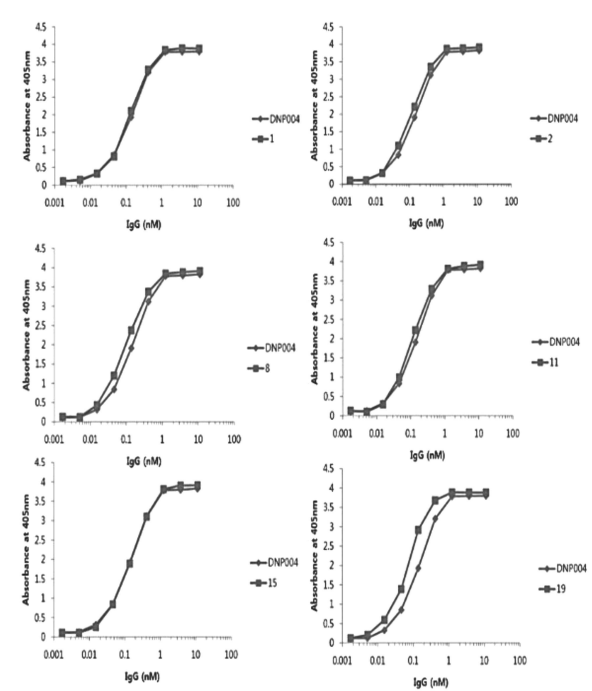
【図 21】



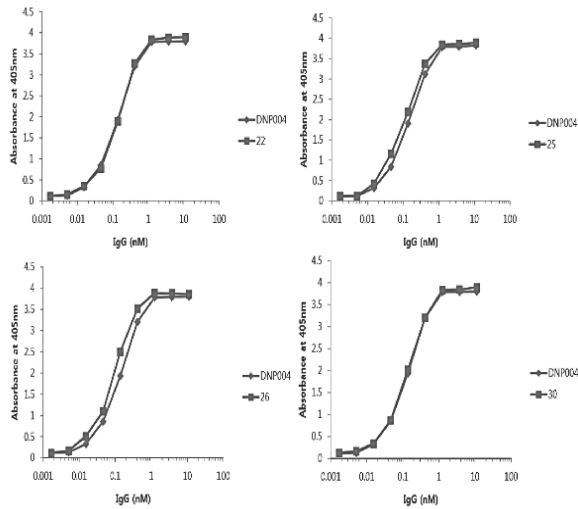
【図 22】



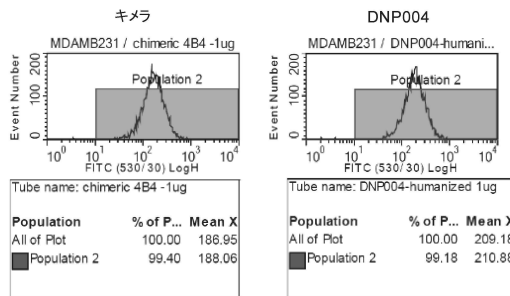
【図 23】



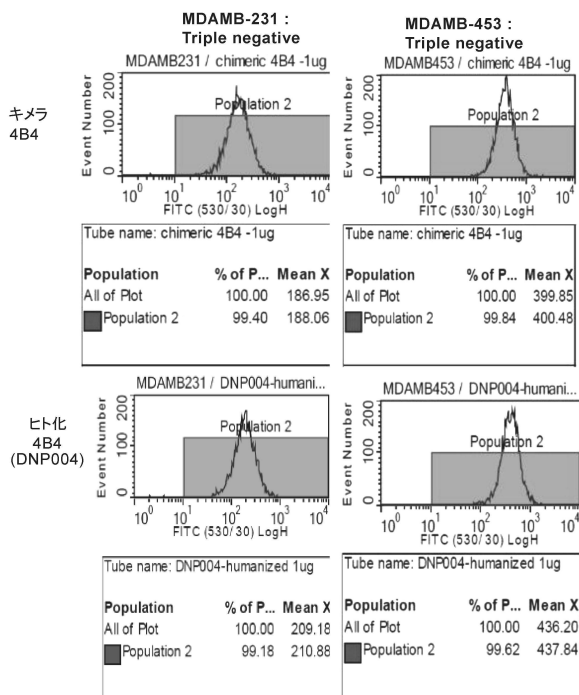
【図 2 4】



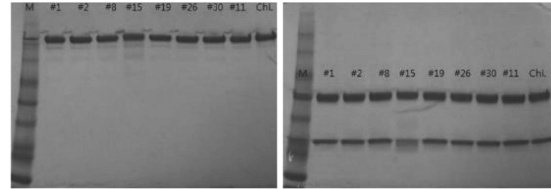
【図 2 5】



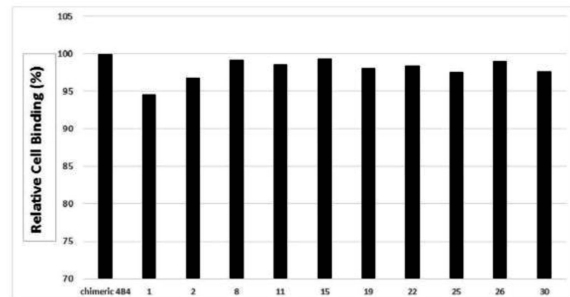
【図 2 8】



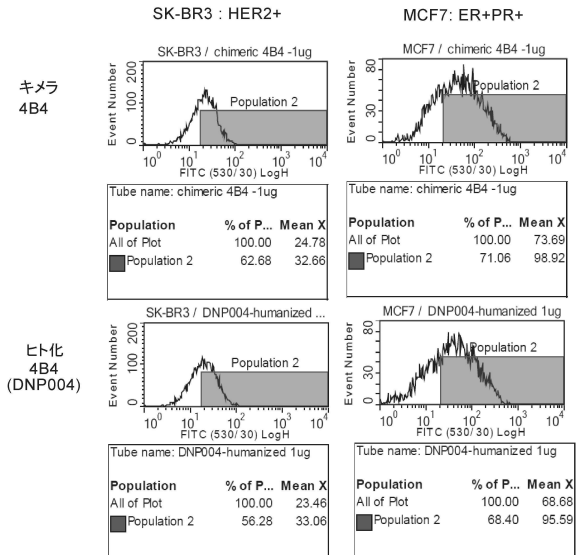
【図 2 6】



【図 2 7】



【図 2 9】

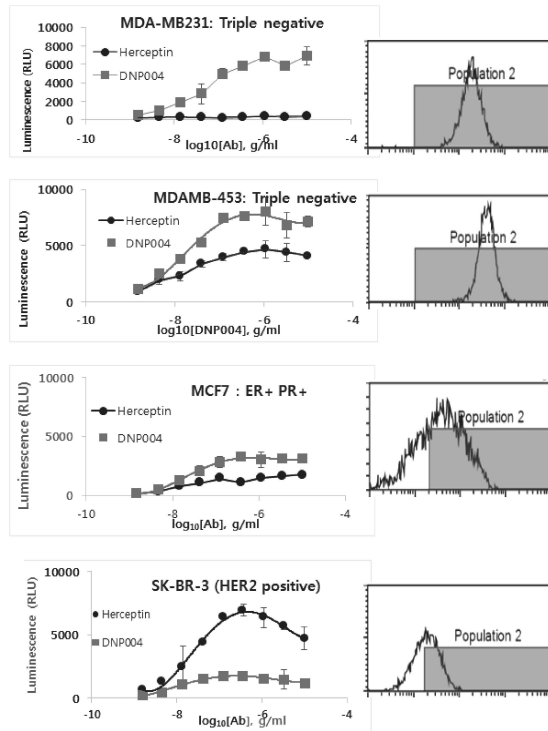


ER: Estrogen receptor

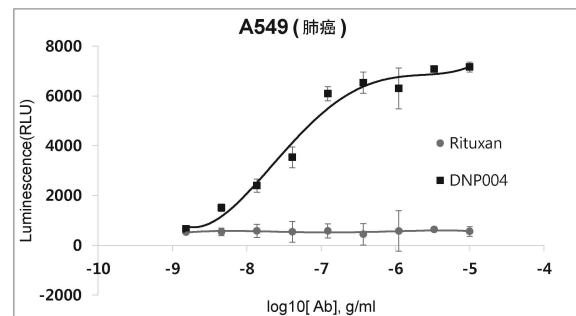
PR: Progesteron Receptor

HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor2

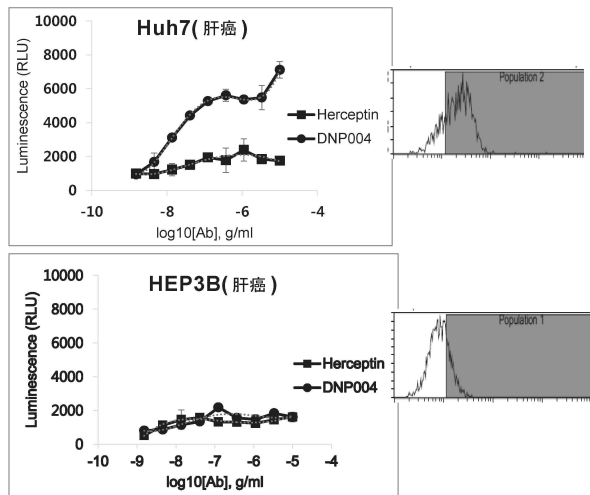
【図 3 0】



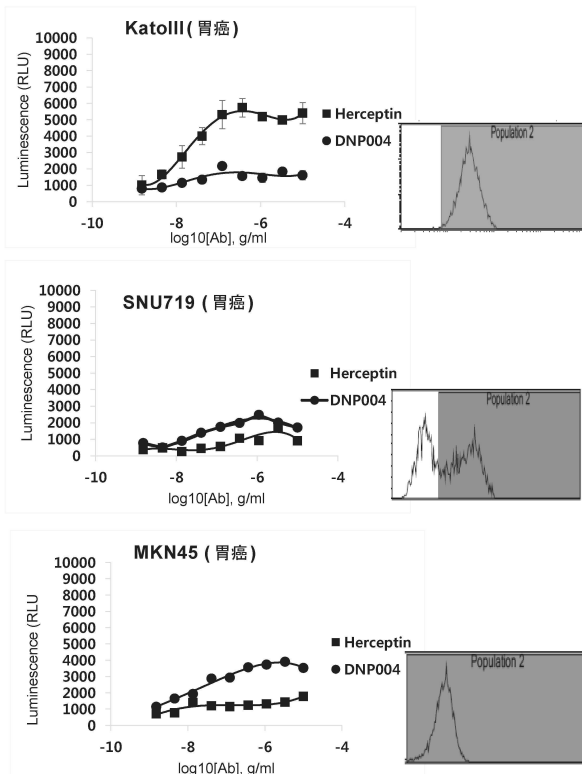
【図 3 1】



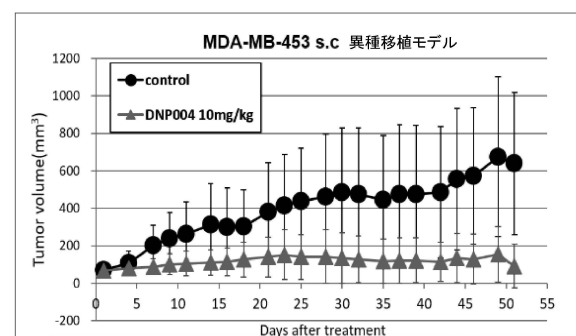
【図 3 2】



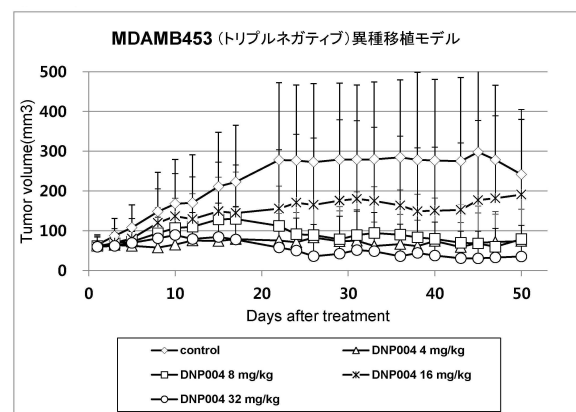
【図 3 3】



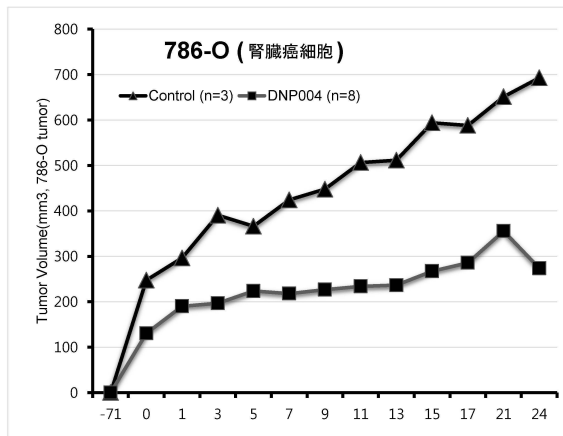
【図 3 4】



【図 3 5】



【図 3 6】



【配列表】

0006947435000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 N	15/06	(2006.01)	C 1 2 N 15/06 1 0 0
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 P
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 T
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
			G 0 1 N 33/574 A

前置審査

- (72)発明者 ユン, サンスン
大韓民国、0 5 2 3 6 ソウル、カンドンーク、ゴドクーロ 1 3 1、ナンバー1 2 8-4 0 3
- (72)発明者 ホン, ジョンウォン
大韓民国、0 5 3 7 4 ソウル、カンドンーク、ヤンジェーデロ・1 0 1-ギル 6 0、ナンバー
4 0 4
- (72)発明者 キム, ウンジョン
大韓民国、0 1 4 6 1 ソウル、トボンーク、トボンーロ・1 1 0ダーギル 5 1、ナンバー1 0
1-1 5 0 2
- (72)発明者 チェ, ダビン
大韓民国、1 8 3 7 6 キョンギード、ファソソーンシ、ヨントンーロ・2 7 ボンーギル 3 5、ナ
ンバー3 0 9-9 0 3

審査官 小林 薫

- (56)参考文献 特表2 0 1 3-5 3 4 4 0 7 (J P, A)
BioMed Res. Int., 2014, Article ID: 309307 (pp.1-11)
J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 2014, Vol.29, No.6, pp.804-810

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
C 1 2 N 1 5/0 0-1 5/9 0
C 0 7 K 1/0 0-1 9/0 0
C A p l u s/REG I S T R Y/M E D L I N E/E M B A S E/B I O S I S/W P I D S
(STN)