

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, — 明細書の別個の部分として表した配列リスト
ML, MR, NE, SN, TD, TG). (規則 5.2(a))

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称： がん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体
技術分野

[0001] 本発明は、がん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体に関する。

背景技術

[0002] ポドカリキシンは、腎系球体の上皮細胞（podocyte；たこ足細胞）で発見されたI型膜貫通タンパク質である（非特許文献1）。ポドカリキシンは558残基のアミノ酸からなり、造血幹細胞マーカーであるCD34と高い相同性をもつ。ポドカリキシンは、細胞外領域にN結合型糖鎖付加部位、グリコサミノグリカン付加部位、及び末端にシアル酸が多く付加したO結合型糖鎖付加部位（ムチンドメイン）を有する、高度に糖鎖付加されたシアロムチンである。発現している組織によって糖鎖付加が異なるため、ポドカリキシンは、150-200kDaの範囲の異なる分子量を有する糖タンパク質である。ポドカリキシンは細胞の接着性、形態形成、及びがんの進行等に関与する。

[0003] ポドカリキシンはシアル酸や硫酸基等の糖鎖付加によって負に荷電し、細胞接着を阻害する。一方、ポドカリキシンは細胞骨格タンパク質等と結合して腎臓のろ過機能に密接に関わっており、接着分子としても機能する（非特許文献2）。

近年、MDCKII細胞において、低分子量Gタンパク質Rabとそのエフェクター分子によってポドカリキシンは極性輸送され、その負電荷によって管腔形成に関わっていることが明らかになってきた（非特許文献3）。

また、ポドカリキシンは、精巣腫瘍（非特許文献4）、乳がん（非特許文献5）、前立腺がん（非特許文献6）、卵巣がん（非特許文献7）、大腸がん（非特許文献8）、及び膵がん（非特許文献9）において高発現しており、悪性度や予後不良のマーカーであることが報告された。がん細胞に発現するポドカリキシン上の糖鎖は内皮細胞上に発現するE-、P-、L-セレク

チンのリガンドとなり、がん細胞の接着・浸潤・転移に関与している（非特許文献9、10）。

[0004] また、ポドカリキシンは未分化細胞に発現しており、近年、未分化細胞のマーカーであるTRA-1-60やTRA-1-81は、ポドカリキシン上のケラタン硫酸をエピトープとする抗体であるが、細胞を分化誘導させると、ポドカリキシンへの反応性が消失することが報告された（非特許文献11）。また、Burkholderia cenocepaciaから精製されたレクチンであるBC2L-Cは未分化細胞マーカーであるが、ポドカリキシン上のO型糖鎖に特異的に結合する（非特許文献12）。これらのことから、ポドカリキシン上の糖鎖修飾は、未分化細胞の分化や、がん細胞における悪性度等を反映していると考えられる。

[0005] ポドカリキシンは血管内細胞に発現していることが知られている（非特許文献1）。これまで開発された抗ポドカリキシン抗体は、この血管内皮細胞に良好な反応性を示す（非特許文献13）。

がんの間質は、線維芽細胞、血管、リンパ管、炎症細胞、免疫細胞、結合組織により特徴的な微小環境を構築している。がんには個性があるように、がんをとりまく微小環境もきわめて多様である。がんの増殖、浸潤、転移のしやすさは、がん細胞の持つ特性のみならず、がん細胞と微小環境との相互関係が深く関わっていると考えられる。近年、がんの微小環境における血管は、正常血管とは異なることが示唆されている。実際、VEGFに対する抗体医薬であるベバシズマブでは、がん微小環境の異常血管を正常血管に戻すことが重要な作用機序とされており、がん微小環境の異常血管を標的とした治療が注目されている。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1: Kerjaschki D et al., J Clin Invest. 1986; 78 (5): 1142-1149.

非特許文献2: Takeda T et al., J Clin Inve

st. 2001; 108 (2) : 289-301.

非特許文献3: Yasuda K et al., Mol Biol Cell. 2012; 23 (16) : 3229-3239.

非特許文献4: Schopperle WM et al., Biochem Biophys Res Commun. 2003; 300 (2) : 285-290.

非特許文献5: Somasiri A et al., Cancer Res. 2004; 64 (15) : 5068-5073.

非特許文献6: Casey G et al., Hum Mol Gene t. 2006; 15 (5) : 735-741.

非特許文献7: Cipollone JA et al., Clin Exp p Metastasis. 2012; 29 (3) : 239-252

非特許文献8: Larsson A et al., Br J Canc e r. 2011; 105 (5) : 666-672.

非特許文献9: Dallas MR et al., Am J Physi ol Cell Physiol. 2012; 303 (6) : C616 -C624.

非特許文献10: Thomas SN et al., Am J Physi ol Cell Physiol. 2009; 296 (3) : C5 05-C513.

非特許文献11: Schopperle WM et al., Stem Cells. 2007; 25 (3) : 723-730.

非特許文献12: Tateno H et al., Stem Cells Transl Med. 2013; 2 (4) : 265-273.

非特許文献13: Kerjaschki D et al., J Cell Biol. 1984 Apr; 98 (4) : 1591-1596.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] がん微小環境に発現しているポドカリキシンのみに特異的に結合する抗体があれば、医薬、診断薬、及び試薬等として有用であると考えられる。

[0008] 本発明が解決しようとする課題は、がん微小環境を標的とした、新規な抗ポドカリキン抗体を提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] これまで我々は、がん特異的抗体を作製する方法として、キャスマブ法を開発した。キャスマブ法により、がん特異的抗体を作製できるだけでなく、膜タンパク質の立体構造認識抗体や、糖鎖とペプチドの両方をエピトープに含む抗糖ペプチド抗体を作製することが可能となった。

[0010] 本発明者らは、キャスマブ法を用いて、異常血管のみに反応し正常血管には反応しない抗ポドカリキン抗体を作製することにより、がん微小環境を標的とした、新規の抗ポドカリキン抗体の樹立が可能であると考えた。

そこで、本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、異常血管のみに反応し正常血管には反応しない抗ポドカリキン抗体を作製することで、がん微小環境を標的とした、新規の抗ポドカリキン抗体の樹立に成功した。

[0011] すなわち、本発明は、以下のとおりである。

[1]

以下 (i) ~ (i i i) のいずれかのがん微小環境を標的とした抗ポドカリキン抗体又はその抗原結合フラグメント：

(i) 以下の6つのCDRの少なくとも1つを有する

重鎖CDR1：GYSFTDY (配列番号：2)

重鎖CDR2：NPRNGG (配列番号：3)

重鎖CDR3：EAMEY (配列番号：4)

軽鎖CDR1：KSSQSLLDSAGKTYLN (配列番号：5)

軽鎖CDR2：RLMYLVSKLA (配列番号：6)

軽鎖CDR3：WQGTHFPRT (配列番号：7)；

(i i) (i) の重鎖 CDR 1～3 及び軽鎖 CDR 1～3 において、1 から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含む重鎖 CDR 1～3 及び軽鎖 CDR 1～3 の少なくとも 1 つを有する；並びに

(i i i) 重鎖 CDR 1～3 及び軽鎖 CDR 1～3 の少なくとも 1 つが、(i) の重鎖 CDR 1～3 及び軽鎖 CDR 1～3 のアミノ酸配列と 80% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。

[2]

配列番号：10 で表されるアミノ酸配列を含む重鎖；

配列番号：10 で表されるアミノ酸配列において、1 から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含むアミノ酸配列を含む重鎖；又は、

配列番号：10 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖を含むがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメント。

[3]

配列番号：8 で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖；

配列番号：8 で表されるアミノ酸配列において、1 から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含むアミノ酸配列を含む軽鎖；又は、

配列番号：8 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖を含むがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメント。

[4]

Fc 領域に 1 以上の N-結合型糖鎖が結合し、該 N-結合型糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない、[1] から [3] のいずれかに記載のがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメント。

[5]

[1] に記載された重鎖 CDR 1～3 及び軽鎖 CDR 1～3 のいずれか 1 つをコードする核酸。

〔6〕

〔2〕に記載された重鎖及び〔3〕に記載された軽鎖のいずれか1つをコードする核酸。

〔7〕

〔5〕又は〔6〕に記載の核酸を含む発現ベクター。

〔8〕

〔7〕に記載の発現ベクターを含む形質転換体。

〔9〕

〔1〕から〔4〕のいずれかに記載のがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメントを有効成分として含む医薬組成物。

〔10〕

抗がん活性を有する物質を結合させた〔1〕から〔4〕のいずれかに記載のがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメントを有効成分として含む医薬組成物。

〔11〕

がんの予防又は治療剤である、〔9〕又は〔10〕に記載の医薬組成物。

発明の効果

[0012] 本発明に係る抗体の製造方法によれば、がん微小環境を標的とした、新規の抗ポドカリキシン抗体を得ることができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1 Aは、ポドカリキシンに対するがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体であるPcMab-60の各濃度における、ヒト膠芽腫細胞株であるLN229に対するフローサイトメトリーの結果を示す。図1 Bは、PcMab-60の各濃度における、ポドカリキシン強制発現LN229 (LN229/hPODXL) に対するフローサイトメトリーの結果を示す。[図2]図2 Aは、ポドカリキシンに対するがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体であるヒトキメラ型PcMab-60 (chPcMab-60

)の各濃度における、LN229に対するフローサイトメトリーの結果を示す。図2Bは、chPcMa b-60の各濃度における、LN229/hPODXLに対するフローサイトメトリーの結果を示す。

[図3]図3A及び図3Bは、それぞれポドカリキシンに対するがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体であるPcMa b-47及びPcMa b-60の、2種類の正常血管内皮細胞に対するフローサイトメトリーの結果を示す。

[図4]図4A～図4Dは、それぞれポドカリキシンに対する抗ポドカリキシン抗体であるPcMa b-47及びPcMa b-60の正常組織に対する免疫組織染色の結果を示す。図4E及び図4Fは、それぞれポドカリキシンに対する抗ポドカリキシン抗体であるPcMa b-47及びPcMa b-60の乳がん組織に対する免疫組織染色の結果を示し、図4E及び図4F中の矢印は、血管内皮細胞を示す。図4Aでは、PcMa b-47により腎臓の正常血管及び糸球体が染色されていることを示し、図4Bでは、PcMa b-60により腎臓の正常血管及び糸球体が染色されないことを示す。図4Cでは、PcMa b-47により小腸の正常血管が染色されていることを示し、図4Dでは、PcMa b-60により小腸の正常血管が染色されないことを示す。図4Eでは、PcMa b-47により乳がん組織のがん細胞だけでなく、周辺の血管も染色されることを示し、図4Fでは、PcMa b-60により乳がん組織のがん細胞周辺の異常血管が染色されることを示す。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明を、発明を実施するための形態により具体的に説明するが、本発明は、以下の発明を実施するための形態に限定されるものではなく、種々変形して実施することができる。

[0015] 本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメントは、以下(i)～(iii)のいずれかである。

(i) 以下の6つのCDRの少なくとも1つを有する

重鎖CDR1: GYSFTDY (配列番号: 2)

重鎖CDR2 : NPRNGG (配列番号 : 3)

重鎖CDR3 : EAMEY (配列番号 : 4)

軽鎖CDR1 : KSSQSLLDSAGKTYLN (配列番号 : 5)

軽鎖CDR2 : RLMYLVSKLA (配列番号 : 6)

軽鎖CDR3 : WQGTHFPRT (配列番号 : 7) ;

(i i) (i) の重鎖CDR1~3及び軽鎖CDR1~3において、1から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含む重鎖CDR1~3及び軽鎖CDR1~3の少なくとも1つを有する ; 並びに

(i i i) 重鎖CDR1~3及び軽鎖CDR1~3の少なくとも1つが、(i) の重鎖CDR1~3及び軽鎖CDR1~3のアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。

本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメントは、異常血管のみに反応し正常血管には反応しない抗ポドカリキシン抗体である。

[0016] 本明細書において「抗体」は、一对のジスルフィド結合で安定化された2本の重鎖(H鎖)と2本の軽鎖(L鎖)が会合した構造をとる。重鎖は、重鎖可変領域VH、重鎖定常領域CH1、CH2、CH3、及びCH1とCH2の間に位置するヒンジ領域からなり、軽鎖は、軽鎖可変領域VLと軽鎖定常領域CLとからなる。この中で、VHとVLからなる可変領域断片(Fv)が、抗原結合に直接関与し、抗体に多様性を与える領域である。また、VL、CL、VH、CH1からなる抗原結合領域をFab領域と呼び、ヒンジ領域、CH2、CH3からなる領域をFc領域と呼ぶ。

可変領域のうち、直接抗原と接触する領域は特に変化が大きく、相補性決定領域(complementarity-determining region: CDR)と呼ばれる。CDR以外の比較的変異の少ない部分をフレームワーク(region: FR)と呼ぶ。軽鎖と重鎖の可変領域には、それぞれ3つのCDR(重鎖CDR1~3及び軽鎖CDR1~3)が存在する。

[0017] 本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体は、モノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であってもよい。また、本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体は、IgG、IgM、IgA、IgD、IgEのいずれのアイソタイプであってもよい。マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ニワトリ等の非ヒト動物に免疫して作製したものであってもよいし、組換え抗体であってもよく、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト化抗体等であってもよい。

「キメラ抗体」とは、異なる種に由来する抗体の断片が連結された抗体を意味する。

「ヒト化抗体」とは、非ヒト由来の抗体に特徴的なアミノ酸配列で、ヒト抗体の対応する位置を置換した抗体を意味し、例えば、マウスに免疫して作製した抗体の重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3を有し、重鎖及び軽鎖のそれぞれ4つのフレームワーク領域（FR）を含むその他のすべての領域がヒト抗体に由来するもの等が挙げられる。かかる抗体は、CDR移植抗体と呼ばれる場合もある。用語「ヒト化抗体」は、ヒトキメラ抗体を含む場合もある。

[0018] 本明細書において、がん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体の「抗原結合フラグメント」とは、がん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体のフラグメントであって、ポドカリキシンに結合するフラグメントを意味する。具体的には、VL、VH、CL、及びCH1領域からなるFab；2つのFabがヒンジ領域でジスルフィド結合によって連結されているF(ab')₂；VL及びVHからなるFv；VL及びVHを人工のポリペプチドリンカーで連結した一本鎖抗体であるscFvのほか、diabody型、scDb型、tandem scFv型、ロイシンジッパー型等の二重特異性抗体等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0019] 本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメントの一態様は、以下の6つのCDRの少なくとも1つを有する。これらのCDRは、ポドカリキシンに対するがん微小環境を標的とし

た抗ポドカリキシン抗体であり、実施例で得られた P c M a b - 6 0 の C D R 配列である。

重鎖 C D R 1 : G Y S F T D Y (配列番号 : 2)

重鎖 C D R 2 : N P R N G G (配列番号 : 3)

重鎖 C D R 3 : E A M E Y (配列番号 : 4)

軽鎖 C D R 1 : K S S Q S L L D S A G K T Y L N (配列番号 : 5)

軽鎖 C D R 2 : R L M Y L V S K L A (配列番号 : 6)

軽鎖 C D R 3 : W Q G T H F P R T (配列番号 : 7)

[0020] 本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメントは、本発明の効果を奏する限り、6つのCDRのうち少なくとも1つを有すればよいが、例えば、2以上、3以上、4以上、5以上、又は6つ有するものとすることができ、含むCDRの数が多い方が好ましい。

[0021] 本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号 : 2 で表されるアミノ酸配列に、1 から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含む鎖 C D R 1 ; 配列番号 : 3 で表されるアミノ酸配列に、1 から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含む重鎖 C D R 2 ; 配列番号 : 4 で表されるアミノ酸配列に、1 から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含む重鎖 C D R 3 ; 配列番号 : 5 で表されるアミノ酸配列に、1 から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含む軽鎖 C D R 1 ; 配列番号 : 6 で表されるアミノ酸配列に、1 から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含む軽鎖 C D R 2 ; 配列番号 : 7 で表されるアミノ酸配列に、1 から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含む軽鎖 C D R 3 の少なくとも1つを有するものであってもよい。

重鎖 C D R 1 ~ 3 (配列番号 : 2 ~ 4) 及び軽鎖 C D R 1 ~ 3 (配列番号 : 5 ~ 7) において、1 から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含む重鎖 C D R 1 ~ 3 及び軽鎖 C D R 1 ~ 3 の少なくとも1つを有する場合、1 から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含む重鎖 C D R 1 ~ 3 及び軽

鎖CDR 1～3の少なくとも1つは、CDRとしての機能を保持する、すなわち、異常血管のみに反応し正常血管には反応しない機能を保持することが好ましい。

[0022] 本明細書において「アミノ酸」は、その最も広い意味で用いられ、天然アミノ酸に加え、人工のアミノ酸変異体や誘導体を含む。アミノ酸は慣用的な一文字表記又は三文字表記で示される場合もある。本明細書においてアミノ酸又はその誘導体としては、天然タンパク質性L-アミノ酸；非天然アミノ酸；アミノ酸の特徴である当業界で公知の特性を有する化学的に合成された化合物等が挙げられる。非天然アミノ酸の例として、主鎖の構造が天然型と異なる、 α 、 α -二置換アミノ酸（ α -メチルアラニンなど）、N-アルキル- α -アミノ酸、D-アミノ酸、 β -アミノ酸、 α -ヒドロキシ酸や、側鎖の構造が天然型と異なるアミノ酸（ノルロイシン、ホモヒスチジンなど）、側鎖に余分のメチレンを有するアミノ酸（「ホモ」アミノ酸、ホモフェニルアラニン、ホモヒスチジンなど）、及び側鎖中のカルボン酸官能基がスルホン酸基で置換されるアミノ酸（システイン酸など）等が挙げられるがこれらに限定されない。

[0023] 本明細書において「1から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含む」という場合、欠失、置換等されるアミノ酸の個数は、結果として得られるポリペプチドがCDRとしての機能を保持する限り特に限定されないが、例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、又は10個とすることができ、1個、2個、3個又は4個とすることが好ましい。置換又は付加されるアミノ酸は、天然のタンパク質性アミノ酸に加えて、非天然のアミノ酸又はアミノ酸アナログであってもよい。アミノ酸の欠失、置換、又は付加の位置は、CDRとしての機能が保持される限り、もとのCDR配列のどこであってもよい。

[0024] 本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメントにおいては、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖CDR 1；配列番号：

3で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖CDR2；配列番号：4で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖CDR3；配列番号：5で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1；配列番号：6で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2；配列番号：7で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3の少なくとも1つを有するものであってもよい。

重鎖CDR1～3（配列番号：2～4）及び軽鎖CDR1～3（配列番号：5～7）において、配列番号：2～7で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3の少なくとも1つを有する場合、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3の少なくとも1つは、CDRとしての機能を保持する、すなわち、異常血管のみに反応し正常血管には反応しない機能を保持することが好ましい。

[0025] 本明細書において、「80%以上の同一性を有する」とは、それぞれ元の配列と変異した配列を有する二つのポリペプチドのアミノ酸配列の一致が最大になるようにアライメントしたときに、共通するアミノ酸残基の数が、元の配列のアミノ酸数の80%以上であることを意味する。

同一性は80%以上であって、CDRとしての機能を保持する限り何%であってもよく、例えば、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上とすることができる。

[0026] 重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列にアミノ酸を付加、置換、又は欠失させたアミノ酸配列からなるCDRや、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるCDRは、部位特異的変異導入法、ランダム変異導入法、チェーンシャフリング法、及びCDRウォーキング法等の公知の方法を用いて

作製され得る。これらの方法によれば、ファージディスプレイ法によってCDRに種々の変異を有する抗体又は抗体断片をファージ表面に提示させ、抗原を使用してスクリーニングすることにより、より親和性が成熟したCDRを得られることが当業者によく知られている（例えば、Wu et al., PNAS, 1998; 95: 6037-6042.; Schier et al., J. Mol. Biol. 1996; 263: 551-567.; Schier et al., J. Mol. Biol. 1996; 255: 28-43.; Yang et al., J. Mol. Biol. 1995; 254: 392-403.）。

[0027] 本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメントは、

配列番号：8で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖；

配列番号：8で表されるアミノ酸配列において、1から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含むアミノ酸配列を含む軽鎖；又は、

配列番号：8で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖

を含む。

配列番号：8で表されるアミノ酸配列は、PcMab-60の軽鎖のアミノ酸配列である。

[0028] 本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメントは、

配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含む重鎖；

配列番号：10で表されるアミノ酸配列において、1から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含むアミノ酸配列を含む重鎖；又は、

配列番号：10で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖

を含む。

配列番号：10で表されるアミノ酸配列は、c h P c M a b - 6 0の重鎖のアミノ酸配列である。

本明細書において、重鎖又は軽鎖のアミノ酸配列において、1から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含む場合、付加、置換、又は欠失するアミノ酸の数は、例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、又は10個とすることができる。その他の用語は、上述したとおりである。

[0029] 本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体は、F c領域に1以上のN-結合型糖鎖が結合し、該N-結合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない抗体であってもよい。

例えばI g G抗体のF c領域には、N-結合型糖鎖の結合部位が2ヶ所存在し、この部位に複合型糖鎖が結合している。N-結合型糖鎖とは、A s n - X - S e r / T h r 配列のA s nに結合する糖鎖をいい、共通した構造M a n 3 G l c N A c 2 - A s nを有する。非還元末端の2つのマンノース (M a n) に結合する糖鎖の種類により、高マンノース型、混成型、及び複合型等に分類される。

N-結合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミン (G l c N A c) にはフコースが結合しうるが、このフコースが結合していない場合、結合している場合に比較してA D C C活性が著しく上昇することが知られている。このことは例えば、国際公開第2002/031140号に記載されている。

A D C C活性が著しく向上することにより、抗体を医薬として用いる場合に投与量を少なくすることができるので、副作用を軽減させることが可能であると共に、治療費も低減させることができる。

[0030] 本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体は、抗がん活性を有する物質を結合させて用いてもよい。

本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体は、異常血管のみに反応し正常血管には反応しないので、がん微小環境の異常血管にの

み抗ポドカリキシン抗体を運搬することができる。そして、抗がん活性を有する物質を結合している場合には、抗がん活性を有する化合物をがん微小環境の異常血管にのみ運搬することができるため、有用である。

[0031] 本明細書において、「抗がん活性を有する物質」とは、腫瘍サイズの低下（遅延又は停止）、腫瘍の転移の阻害、腫瘍増殖の阻害（遅延又は停止）、及びがんに関連する一つ又は複数の症状の緩和、の少なくとも1つを生じさせる物質を意味する。具体的には、毒素、抗がん剤、及びラジオアイソトープを挙げるができるがこれらに限定されない。

[0032] 抗がん活性を有する毒素としては、例えば、緑膿菌外毒素（PE）又はその細胞障害性フラグメント（例えばPE38）、ジフテリア毒素、及びリシンA等が挙げられる。抗がん活性を有する毒素は、抗ポドカリキシン抗体と共に毒素が取り込まれる細胞、即ちポドカリキシンを発現しているがん細胞のみに毒性を発揮するので、周囲の細胞に悪影響を与えず、特異的に効果を得られるという利点がある。

[0033] 抗がん剤としては、例えば、アドリアマイシン、ダウノマイシン、マイトマイシン、シスプラチン、ビンクリスチン、エピルビシン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、アクラシノマイシン、ナイトロジェン・マスタード、サイクロフォスファミド、ブレオマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、タモキシフェン、及びデキサメタゾン等の低分子化合物や、並びに免疫担当細胞を活性化するサイトカイン等のタンパク質が挙げられ、免疫担当細胞を活性化するサイトカインとしては、例えば、ヒトインターロイキン2、ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、ヒトマクロファージコロニー刺激因子、及びヒトインターロイキン12等が挙げられる。

[0034] 抗がん活性を有するラジオアイソトープとしては、 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{131}I 、 ^{211}At 、及び ^{90}Y 等が挙げられる。ラジオアイソトープは、抗ポドカリキシン抗体が結合する細胞、即ちポドカリキシンを発現している細胞の周囲の細胞にも毒性を発揮する。一般に、がん細胞は均一ではなく、

すべてのがん細胞がポドカリキシンを発現しているわけではないので、周囲のポドカリキシン陰性のがん細胞を殺すためにラジオアイソトープは有用である。なお、ラジオアイソトープを結合させる場合、F a b や s c F v 等の抗ポドカリキシン抗体のフラグメントに結合させて用いてもよい。

[0035] 抗がん活性を有する物質は、公知の方法によってがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体に直接結合させることができる。また、例えばリポソーム等の担体に封入してがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体に結合させてもよい。

[0036] 抗がん活性を有する物質が蛋白質やポリペプチドの場合は、本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体をコードする核酸（後述）と抗がん活性を有する物質をコードするDNAを連結し、適当な発現ベクターに挿入することにより、抗がん活性を有する物質とがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体との融合タンパク質として発現させてもよい。

[0037] (核酸)

本発明は、本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体をコードする核酸も包含する。核酸は、天然の核酸であっても人工の核酸であってもよく、例えば、DNA、RNA、DNAとRNAのキメラが挙げられるがこれらに限定されない。がん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体をコードする核酸の塩基配列は、当業者が公知の方法又はそれに準ずる方法に従って決定することができ、公知の方法又はそれに準ずる方法で調製することができる。

本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体をコードする核酸としては、例えば、配列番号：10で表されるc h P c M a b - 6 0の重鎖をコードするDNA（配列番号：11）、配列番号：8で表されるP c M a b - 6 0の軽鎖をコードするDNA（配列番号：9）が挙げられるがこれらに限定されない。

P c M a b - 6 0のCDRのそれぞれをコードする核酸は、これらの配列番号で示されるDNA配列に含まれている。

[0038] (発現ベクター)

本発明は、本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体をコードする核酸を含む発現ベクターを包含する。発現ベクターは、使用する宿主細胞にあわせて適宜選択することができ、例えば、プラスミド、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、カリフラワーモザイクウイルスベクターやタバコモザイクウイルスベクターなどの植物ウイルスベクター、コスミド、YAC、及びEBV由来エピソーム等が挙げられる。これらの発現ベクターには、公知の方法 (制限酵素を利用する方法等) で、本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体をコードする核酸を挿入することができる。

[0039] 本発明に係る発現ベクターは、さらに、抗体遺伝子の発現を調節するプロモーター、複製起点、選択マーカー遺伝子等を含むことができる。プロモーター及び複製起点は、宿主細胞と発現ベクターの種類によって適宜選択することができる。

[0040] (形質転換体)

本発明は、本発明に係る発現ベクターを含む形質転換体を包含する。形質転換体は、本発明に係る発現ベクターを適切な宿主細胞にトランスフェクトすることによって得ることができる。宿主細胞としては、例えば、哺乳類細胞 (CHO細胞、COS細胞、ミエローマ細胞、HeLa細胞、及びVeroblastoid細胞など)、昆虫細胞、植物細胞、及び真菌細胞 (サッカロミセス属及びアスペルギルス属など) 等の真核細胞、並びに大腸菌 (E. coli) 及び枯草菌等の原核細胞を用いることができる。

[0041] 本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体は、例えば、キャスマブ法を用いて得られるがん細胞特異的に発現するポドカリキシンに対する抗体 (がん細胞特異的抗ポドカリキシン抗体) を得る際に、免疫組織染色によるスクリーニングを行うことによって製造することができる。

がん細胞特異的抗ポドカリキシン抗体を得る方法は、

がん細胞特異的糖鎖構造を発現する細胞に、ポドカリキシンの全部又は一

部をコードする核酸を導入してがん細胞特異的ポドカリキシン又はその一部を発現させる工程と、

前記がん細胞特異的ポドカリキシン又はその一部を非ヒト哺乳動物に免疫して抗体を得る工程と、

前記抗体を、精製したがん細胞特異的ポドカリキシン又はその一部を用いた一次スクリーニングで精製する工程と、を含む。

[0042] 本明細書において「がん細胞特異的抗ポドカリキシン抗体」は、がん細胞に発現するポドカリキシンとの反応性の方が、正常細胞に発現するポドカリキシンとの反応性より有意に高い抗体を意味する。一態様において、「がん細胞特異的抗ポドカリキシン抗体」は、がん細胞に発現するポドカリキシンと反応し、正常細胞に発現するポドカリキシンとはまったく反応しない。一態様において、「がん細胞特異的抗ポドカリキシン抗体」は、がん細胞に発現するポドカリキシンとの反応性が著しく高い一方、正常細胞に発現するポドカリキシンともある程度反応する。

[0043] ポドカリキシンは、精巣腫瘍、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、大腸がん、膵がん等に高発現している一方、正常細胞にも発現している。

ヒトポドカリキシン (BC143318, NM_001018111) は、配列番号：1で表されるタンパク質であるが、本明細書において「ポドカリキシン」という場合、その機能的な変異体も含まれる。

[0044] 本明細書において「がん細胞特異的糖鎖構造を発現する細胞」は、がん細胞特異的糖鎖構造を発現する細胞であればどのような細胞であってもよい。例えば、がん細胞であってもよいし、非がん細胞に必要な糖転位酵素を導入し、がん細胞特異的糖鎖構造を発現するように人工的に改変した細胞であってもよい。「がん細胞特異的糖鎖構造を発現する細胞」としては、例えば以下の細胞が挙げられる。

一 膠芽腫細胞株 LN229 由来細胞。

本発明者らは、これまでに、脳腫瘍では悪性度に応じてケラタン硫酸修飾が亢進することを確認し (Kato Y et al., Biochem

Biophys Res Commun. 2008; 369 (4) : 1041-1046.)、脳腫瘍細胞株の中から高度にケラタン硫酸修飾の起こっているLN229細胞を発見している (Hayatsu N et al., Biochem Biophys Res Commun. 2008; 368 (2) : 217-222.)。また、astrocytic tumorにおいてポドカリキシンが悪性度と相関して高発現していることを報告している (Hayatsu N et al., Biochem Biophys Res Commun. 2008; 374 (2) : 394-398.)。さらに、LN229細胞により発現させたタンパク質には、シアル酸ががん細胞特異的に付加することを報告している (Kato Y et al., Sci Rep. 2014; 4: 5924)。

— 膠芽腫細胞株LN464細胞に糖転移酵素のKSGal6STを遺伝子導入した細胞 (Hayatsu N et al., Biochem Biophys Res Commun. 2008; 368: 217-222.)。本発明者らは、この文献において、膠芽腫細胞株LN464細胞に糖転移酵素のKSGal6STを遺伝子導入すると、脳腫瘍組織で高発現することが知られているケラタン硫酸の高発現株ができることを報告している。

— 子宮頸がん細胞 (HeLa細胞) や白血病細胞 (Namalwa細胞) に糖転移酵素を遺伝子導入した細胞 (Kimura H et al., Biochem Biophys Res Commun. 1997 Aug 8; 237 (1) : 131-137.)。この文献では、本発明者らが、子宮頸がん細胞 (HeLa細胞) や白血病細胞 (Namalwa細胞) に糖転移酵素を遺伝子導入し、どのような糖鎖を付加するかを詳細に見ている。

— Namalwa細胞に糖転移酵素を遺伝子導入した細胞 (Kaneko M et al., FEBS Lett. 1999; 452 (3) :

237-242.)。この文献では、本発明者らが、N a m a l w a細胞に糖転移酵素を遺伝子導入し、どのような糖鎖を付加するかを詳細に見ている。

ーサル腎臓細胞 (C O S 1細胞) に糖転移酵素を導入した細胞 (K a n e k o M e t a l . , B l o o d . 1997 ; 90 (2) : 839-849.)。

ーハムスター卵巣細胞 (C H O - L e c 1細胞) に糖転移酵素を導入した細胞 (K a n e k o M e t a l . , F E B S L e t t . 2003 ; 554 (3) : 515-519.)。

[0045] がん細胞特異的糖鎖構造を発現する細胞として、トリコスタチンA処理ニワトリB細胞由来D T 4 0細胞株を用いてもよく、抗体の製造方法として、トリコスタチンA処理ニワトリB細胞由来D T 4 0細胞株から抗体産生株を取得するA d l i b法 (S e o H e t a l . , N a t . B i o t e c h n o l . 2002 ; 6 : 731-736.) を用いてもよい。また、非ヒト哺乳動物として、マウス抗体遺伝子が破壊されヒト抗体遺伝子が導入されたマウスであるK Mマウスを用いてもよく、抗体の製造方法として、K Mマウスに免疫してヒト抗体を作製する方法 (I t o h K e t a l . , J p n . J . C a n c e r R e s . 2001 ; 92 : 1313-1321. ; K o i d e A e t a l . , J . M o l . B i o l . 1998 ; 284 : 1141-1151.) 等を用いてもよい。

[0046] 本明細書において「がん細胞特異的糖鎖構造を発現する細胞に、ポドカリキシンの全部又は一部をコードする核酸を導入して発現させる工程」は、常法に従って当業者が行うことができるが、がん細胞特異的抗ポドカリキシン抗体の製造方法においては、がん細胞にポドカリキシンの全部又は一部をコードする核酸を導入して強制発現させることにより得られたがん細胞特異的ポドカリキシン又はその一部を抗原として用いることを特徴とする。ポドカリキシンの一部をコードする核酸としては、がん細胞特異的糖鎖が結合して

いるポドカリキシンの部分をコードする核酸を用いることができる。がん細胞特異的糖鎖が結合しているポドカリキシンの部分をコードする核酸としては、ポドカリキシンの細胞外領域をコードする核酸が挙げられる。本明細書において核酸は目的のタンパク質を発現できる限りどのような核酸であってもよいが、DNA、RNA、又はDNA/RNAキメラ、人工核酸等が挙げられる。

[0047] 一態様において、ポドカリキシンの全部又は一部を分泌型として発現させる。これは、ポドカリキシンの細胞外領域をコードする核酸を、がん細胞特異的糖鎖構造を発現する細胞に導入することにより行うことができる。分泌型として発現されたポドカリキシンは、がん細胞特異的糖鎖構造を発現する細胞の培養上清から精製することができる。例えば、ポドカリキシンを適当なタグをつけた状態で発現させ、かかるタグを利用して精製してもよい。

[0048] 本明細書において「がん細胞特異的ポドカリキシン又はその一部を非ヒト哺乳動物に免疫して抗体を得る工程」は、がん細胞特異的ポドカリキシン又はその一部を非ヒト哺乳動物に投与することによって行うことができる。精製したがん細胞特異的ポドカリキシン又はその一部を用いてもよい。

免疫は、例えば、がん細胞特異的ポドカリキシン又はその一部を、必要に応じてアジュバントと共に、皮下、皮内、筋肉内、静脈内、又は腹腔内に注射して行うことができる。

[0049] 非ヒト哺乳動物の免疫工程は、がん細胞特異的ポドカリキシンを分泌型として発現させず、膜タンパク質として発現させ、細胞ごと非ヒト哺乳動物に投与して行ってもよい。

免疫は、常法に従って行うことができるが、例えば $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ の細胞を腹腔内に、10日に1回ずつ、複数回投与することにより行うことができる。

[0050] 本明細書において、非ヒト哺乳動物とは、典型的にはマウスであるが特に限定されず、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、サル、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ等が挙げられる。

[0051] 本明細書において「抗体の一次スクリーニング」とは、抗体産生細胞から目的の抗体を同定していく過程における最初のスクリーニングをいい、例えば、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清を用いたスクリーニングをいう。

抗体の一次スクリーニングにおいては、モノクローナル抗体を取得する工程及びモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを特定する工程を含むことが好ましい。

本発明における抗体の一次スクリーニングは、概して以下のように行われる。

まず、がん細胞特異的糖鎖構造を発現する細胞にポドカリキシン又はその一部をアフィニティータグ（FLAGタグ、Hisタグ、Mycタグ、PATAG、等）と共に発現させ、当該アフィニティータグを用いて精製を行う。こうして精製したがん細胞特異的ポドカリキシン又はその一部をELISAプレートに固相化し、ここに抗体産生細胞から得られた抗体を加え、反応するウェルを選択する。この方法により、スクリーニングの初期の段階で、がん細胞特異的抗体を選択することができる。

精製したがん細胞特異的ポドカリキシン又はその一部とは、精製タンパク質又はその一部であれば特に限定されるものではなく、強制発現されたタンパク質を精製したものであってもよく、内在性のタンパク質を精製したものであってもよい。

[0052] がん細胞特異的抗ポドカリキシン抗体の製造方法は、一次スクリーニングの後、がん細胞又は組織と、正常細胞又は組織とに対する抗体の反応性を比較し、がん細胞又は組織に対する反応性が、正常細胞又は組織に対する反応性より優位に高い抗体を選択する工程を含んでいてもよい。

がん細胞又は組織としては、脳腫瘍、前立腺がん、精巣腫瘍、腎がん、甲状腺がん、膀胱がん、乳がん、卵巣がん、大腸がん、膵がん、悪性中皮腫、骨肉腫における細胞又は組織が挙げられ、正常細胞としては、血管内皮細胞及び、腎上皮細胞等が挙げられる。また、正常組織としては、全身の血管及

び腎臓等が挙げられる。

がん細胞又は組織としては、1) 腺がん（肺腺がん、肝臓腺がん、膵臓腺がん、リンパ腺がん、子宮腺がん、精のう腺がん、胃腺がん等）、2) 基底細胞がん（皮膚がん等）、3) 扁平上皮がん（口腔がん、舌がん、咽頭がん、食道がん、咽頭がん、子宮頸部がん等）、4) 肉腫（リンパ管肉腫、カポジ肉腫、悪性骨肉腫等）、5) 造血器腫瘍（急性・慢性骨髄性白血病、急性前骨髄性白血病、及び急性・慢性リンパ性白血病などの白血病、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫などのリンパ腫、並びに多発性骨髄腫等）、6) その他、腎細胞がん等の細胞又は組織であってもよい。

[0053] 本明細書において、「がん細胞又は組織と、正常細胞又は組織とに対する前記抗体の反応性を比較する工程」は、がん細胞又は組織と一次スクリーニングで得られた抗体とを反応させ、結合の有無を検出し、一方で、正常細胞又は組織と一次スクリーニングで得られた抗体とを反応させ、結合の有無を調べる工程を意味する。この工程は、フローサイトメトリー、免疫組織染色（IHC）、免疫細胞染色（ICC）等により行うことができる。

[0054] がん細胞又は組織と抗体の反応性、正常細胞又は組織と抗体の反応性を比較した後、がん細胞又は組織に対する反応性が、前記正常細胞又は組織に対する反応性より有意に高い抗体を選択することにより、がん細胞特異的抗体を得ることができる。

選択されたがん細胞特異的抗体は、その後さらに精製することができる。

[0055] 本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体の製造方法は、一次スクリーニングの後、異常血管と、正常血管に対する前記抗体の反応性を比較する工程を含む。

本明細書において、「異常血管と、正常血管に対する前記抗体の反応性を比較する工程」は、がん細胞又は組織と一次スクリーニングで得られた抗体とを免疫組織染色により染色し、異常血管における結合の有無を検出し、一方で、正常細胞又は組織と一次スクリーニングで得られた抗体とを免疫組織染色により染色し、正常血管における結合の有無を調べる工程を意味する。

免疫組織染色により、異常血管と、正常血管に対する抗体の反応性を比較し、異常血管に対する反応性が、正常血管に対する反応性より優位に高い抗体を選択する。本発明における製造方法においてより好適には、異常血管に対して反応し、正常血管に対して反応しない抗体を選択する。

選択されたがん微小環境を標的とした抗体は、その後さらに精製してもよい。

[0056] 異常血管は、血管新生 (Angiogenesis) により生じる。血管新生は、既存の血管から新たな血管枝が分岐し、血管網を構築する生理的現象である。広義では胚形成期において新たに血管が作られる脈管形成 (Vasculogenesis) も含めて血管新生と呼ぶが、厳密には血管新生と脈管形成は区別される。創傷治癒の過程でも血管新生が生じることが知られており、血管新生は慢性炎症においても重要な役割を担っている。

そこで、本明細書においては、がんの微小環境における血管新生によって生じた血管のことを、異常血管と定義する。すべてのがん細胞は、血管からの栄養の供給を必要とするため、すべてのがんで異常血管が存在する。

正常血管としては、がんの微小環境における血管新生によって生じた血管以外の血管を意味する。したがって、炎症や創傷治癒の過程などでも血管新生が起こるが、それらは本明細書においては、正常血管に分類される。

異常血管としては、上述のがん細胞又は組織に存在する血管を用いることができ、正常血管としては、正常細胞又は組織に存在する血管を用いることができる。

[0057] 本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体は、以下に記載する方法によって得られるがん細胞特異的抗ポドカリキシン抗体から免疫組織染色によるスクリーニングにより製造することもできる。

がん細胞特異的抗ポドカリキシンモノクローナル抗体は、がん細胞特異的ポドカリキシン又はその一部を免疫した非ヒト哺乳動物から抗体産生細胞を単離し、これを骨髓腫細胞等と融合させてハイブリドーマを作製し、このハイブリドーマが産生した抗体を精製することによって得ることができる。ま

た、がん細胞特異的抗ポドカリキシンポリクローナル抗体は、がん細胞特異的ポドカリキシン又はその断片を免疫した動物の血清から得ることができる。

[0058] 本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体を遺伝子組換え法で作製する場合、例えば、本発明に係る核酸を含む発現ベクターで適当な宿主を形質転換し、この形質転換体を適当な条件で培養して抗体を発現させ、公知の方法に従って単離精製すればよい。

単離精製方法としては、例えば、プロテインA/G/L等を用いたアフィニティカラム、その他のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析が挙げられ、これらを適宜組み合わせることができる。

[0059] 所定のエピトープの配列に結合する抗体は、当業者が公知の方法又はそれに準ずる方法で作製することができる。例えば、エピトープ配列を含むペプチドを固相担体に固定し、当該ペプチドと複数の抗体の結合を検出することにより、同エピトープに特異的に結合する抗体を得ることができる。

ここで、「複数の抗体」としては、動物に抗原タンパク質又はその部分ペプチドを免疫することによって得たものを用いてもよいし、ファージディスプレイ法によって作製した抗体ライブラリ又は抗体フラグメントライブラリを用いてもよい。ファージディスプレイ法によるライブラリを用いる場合、エピトープ配列を含むペプチドを固相担体に固定しパニングを繰り返すことによって、同エピトープに特異的に結合する抗体を得ることもできる。

[0060] ヒトキメラ抗体及びヒトCDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体を産生するハイブリドーマのmRNAから抗体遺伝子をクローン化し、これをヒト抗体遺伝子の一部と遺伝子組換え技術で連結することによって作製することができる。

例えば、ヒト型キメラ抗体の場合、マウス抗体を産生するハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素によりcDNAを合成し、重鎖可変領域（VH）及び軽鎖可変領域（LH）をPCRでクローニングして配列を解析する。次に、一致率の高い抗体塩基配列から、リーダー配列を含む5'プライマーを

作製し、5'プライマーと可変部3'プライマーによって上記cDNAから、シグナル配列から可変領域の3'末端までをPCRでクローニングする。一方で、ヒトIgG1の重鎖及び軽鎖の定常領域をクローニングし、重鎖と軽鎖それぞれについて、マウス抗体由来可変領域と、ヒト抗体由来定常領域とをPCRによるOverlapping Hanging法で連結し、増幅する。得られたDNAを適当な発現ベクターに挿入し、これを形質転換して、ヒト型キメラ抗体を得ることができる。

[0061] CDR移植抗体の場合、使用するマウス抗体可変部と最も相同性の高いヒト抗体可変部を選択してクローン化し、メガプライマー法を用いた部位選択的突然変異導入により、CDRの塩基配列を改変する。フレームワーク領域を構成するアミノ酸配列をヒト化すると抗原との特異的な結合ができなくなる場合には、フレームワークの一部のアミノ酸をヒト型からラット型に変換してもよい。

元の配列において、1から数個の、好ましくは1又は2個のアミノ酸の欠失、置換又は付加を有するアミノ酸配列からなるCDRや、元の配列に80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるCDRは、部位特異的変異導入法、ランダム変異導入法、チェーンシャフリング法、CDRウォーキング法等の公知の方法を用いて作製され得る。

これらの方法により、ファージディスプレイ法によってCDRに種々の変異を有する抗体又は抗体断片をファージ表面に提示させ、抗原を使用してスクリーニングすることにより、より親和性が成熟したCDRを得られることが当業者によく知られている（例えば、Wu et al., PNAS, 1998; 95: 6037-6042.; Schier et al., J. Mol. Biol. 1996; 263: 551-567.; Schier et al., J. Mol. Biol. 1996; 255: 28-43.; Yang WP et al., J. Mol. Biol. 1995; 254: 392-403.）。本発明は、このような方法で成熟させたCDRを含む抗体も包含

する。

[0062] 本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体の抗原結合フラグメントは、当該フラグメントをコードするDNAを用いて上述の方法で発現させてもよいし、また、全長の抗体を得てからパイン、ペプシン等の酵素で処理して断片化してもよい。

[0063] 本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体は、作製方法や精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点、糖鎖の有無、形態等が異なり得る。しかしながら、得られた抗体が、がん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体として同等の機能を有している限り、本発明に含まれる。例えば、本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体を、大腸菌等の原核細胞で発現させた場合、本来の抗体のアミノ酸配列のN末端にメチオニン残基が付加される。本発明は、かかる抗体も包含する。

[0064] 本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体が、還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していないN-結合型糖鎖を有する抗体である場合、かかる抗体は公知の方法又はそれに準ずる方法に従って製造することができる。かかる抗体の製造方法は、例えば、国際公開第2002/031140号、特開2009-225781号公報に記載されている。

具体的には、例えば、本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体をコードするDNAを含む発現ベクターを用いて、GDP-フコースの合成に関する酵素の活性、又は α -1, 6-フコシルトランスフェラーゼの活性が低下又は欠失した細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養した後、目的とするがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体を精製することによって得ることができる。

GDP-フコースの合成に関する酵素としては、例えば、GDP-mannose 4, 6-dehydratase (GMP)、GDP-keto-6-deoxymannose 3, 5-epimerase, 4-reductase (Fx)、GDP-beta-L-fucose pyr

o p h o s p h o r y l a s e (G F P P) が挙げられる。

ここで、細胞は特に限定されないが、哺乳動物細胞が好ましく、例えば上記酵素活性を低下又は欠失されたCHO細胞を用いることができる。

上記方法によって得られる抗体組成物は、還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合している抗体を含む場合もあるが、フコースが結合している抗体の割合は、抗体全体の20重量%以下、好ましくは10重量%以下、さらに好ましくは5重量%以下、最も好ましくは3重量%以下である。

[0065] また、還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していないN-結合型糖鎖を有する抗体は、本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体をコードするDNAを含む発現ベクターを昆虫卵に導入し、孵化させて昆虫を成長させ、必要に応じて交配を行ってトランスジェニック昆虫を作製し、当該トランスジェニック昆虫又はその分泌物からがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体を抽出することによっても得ることができる。昆虫としてはカイコを用いることができ、その場合、繭から抗体を抽出することができる。

この方法によって得られる抗体組成物も、還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合している抗体を含む場合もあるが、フコースが結合している抗体の割合は、抗体全体の20重量%以下、好ましくは10重量%以下、さらに好ましくは5重量%以下、最も好ましくは3重量%以下である。

[0066] (本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体の活性)

抗体医薬の薬効メカニズムは、抗体が有する2つの生物活性に基づいている。1つは標的抗原特異的な結合活性であり、結合することによって標的抗原分子の機能を中和する活性である。標的抗原分子の機能の中和はFab領域を介して発揮される。

[0067] もう1つは、エフェクター活性と呼ばれる抗体の生物活性である。エフェクター活性は、抗体のFc領域を介して、抗体依存性細胞障害活性(ant

body-dependent cellular cytotoxicity; ADCC)、補体依存性細胞障害活性 (complement-dependent cytotoxicity; CDC)、アポトーシスの直接誘導等の態様で発揮される。

本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体の活性は、以下の方法で測定することができる。

[0068] (1) 結合活性

抗体の結合活性は公知の方法、例えば、ELISA (酵素結合免疫吸着検定法)、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法)、蛍光抗体法、FACS法等で、測定することができる。

[0069] (2) ADCC活性

ADCC活性とは、標的細胞の細胞表面抗原に本発明の抗体が結合した際、そのFc部分にFc γ 受容体保有細胞 (エフェクター細胞) がFc γ 受容体を介して結合し、標的細胞に障害を与える活性を意味する。

ADCC活性は、ポドカリキシンを発現している標的細胞とエフェクター細胞と本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体を混合し、ADCCの程度を測定することによって知ることができる。エフェクター細胞としては、例えば、マウス脾細胞、ヒト末梢血や骨髄から分離した単球核を利用することができる。標的細胞は、例えばポドカリキシン陽性がん細胞とすることができる。標的細胞をあらかじめ ^{51}Cr 等で標識し、これに本発明の抗体を加えてインキュベーションし、その後標的細胞に対して適切な比のエフェクター細胞を加えてインキュベーションを行う。インキュベーション後、上清を採取し、上清中の上記標識をカウントすることにより、測定することが可能である。

[0070] (3) CDC活性

CDC活性とは、補体系による細胞障害活性を意味する。

CDC活性は、ADCC活性の試験において、エフェクター細胞に代えて補体を用いることにより測定することができる。

[0071] (4) 腫瘍増殖抑制活性

腫瘍増殖抑制活性は、腫瘍モデル動物を利用して測定することができる。例えば、マウスの皮下に腫瘍を移植し、本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体を投与する。非投与群と投与群における腫瘍組織の体積を比較することにより、腫瘍増殖抑制効果を測定することができる。

なお、腫瘍増殖抑制活性は、個々の細胞の増殖を抑制する結果生じるものであっても、細胞死を誘導する結果生じるものであってもよい。

[0072] (医薬組成物)

本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメントは、ポドカリキシンを発現するがんの予防又は治療に用いてもよい。本発明に係る医薬組成物の一態様は、本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメントを有効成分として含み、さらに薬学的に許容できる担体や添加物を含む。

[0073] 本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメントは、がん細胞を標的とする薬物の送達に用いてもよい。本発明に係る医薬組成物の別の態様は、上述した抗がん活性を有する物質やその他の抗がん剤を結合させたがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、さらに薬学的に許容できる担体や添加物を含む。

[0074] 担体及び添加物の例としては、水、食塩水、リン酸緩衝液、デキストロース、グリセロール、エタノール等薬学的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビ

ツール、ラクトース、界面活性剤等が挙げられるがこれらに限定されない。

[0075] 本発明に係る医薬組成物は、様々な形態、例えば、液剤（例えば注射剤）、分散剤、懸濁剤、錠剤、丸剤、粉末剤、坐剤等とすることができる。好ましい態様は、注射剤であり、非経口（例えば、静脈内、経皮、腹腔内、筋内）で投与することが好ましい。

[0076] 本発明に係る医薬組成物は、ポドカリキシンが関連する疾患、特にがんの治療に有効である。

ポドカリキシンが関連するがんとしては、例えば、脳腫瘍、前立腺がん、精巣腫瘍、腎がん、甲状腺がん、膀胱がん、乳がん、卵巣がん、大腸がん、膵がん、悪性中皮腫、骨肉腫等が挙げられるがこれらに限定されない。本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体は、これらのがん特に有用である。

また、本発明に係る医薬組成物は、上述のがんに対するドラッグデリバリー製剤として用いることもできる。

[0077] 本発明は、本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメントを治療有効量投与することを含むポドカリキシンが関連する疾患の治療方法も包含する。

本明細書において、治療有効量とは、治療する疾患の一つ又は複数の症状が、それによりある程度緩和される作用物質の量を意味する。抗がん剤の場合、腫瘍サイズの低下；腫瘍の転移の阻害（遅延又は停止）；腫瘍増殖の阻害（遅延又は停止）、及びがんに関連する一つ又は複数の症状の緩和、の少なくとも一つを示す量を意味する。

具体的には、本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメントの投与量は、例えば、0.025～50 mg/kg、好ましくは0.1～50 mg/kgであり、より好ましくは0.1～25 mg/kg、さらに好ましくは0.1～10 mg/kg又は0.1～3 mg/kgとすることができるが、これに限定されない。

[0078] （検査方法、検査薬、検査キット）

上述のとおり、ポドカリキシンは特定のがん細胞において高発現している。従って、本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体は、がん、特に脳腫瘍、前立腺がん、精巣腫瘍、腎がん、甲状腺がん、膀胱がん、乳がん、卵巣がん、大腸がん、膵がん、悪性中皮腫、骨肉腫等のポドカリキシンが高発現するがんの診断に有用である。本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体は、異常血管に選択的に結合するので、診断に特に有用である。

本発明は、本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体を含むがんの検査薬、がんの検査のための抗体の使用、本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体を用いるがんの検査方法をも包含する。

[0079] 本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体をがんの検査方法に用いる場合、検査に用いられるサンプルは、例えば、対象から採取されたがんが疑われる組織、血清、髄液、尿、体液（唾液、汗など）とすることができる。ポドカリキシンは、膜タンパク質であるが、血清中に分泌されることが知られている。

[0080] 検査方法としては、例えば、イムノアッセイ、凝集法、比濁法、ウエスタンブロッティング法、表面プラズモン共鳴（SPR）法等が挙げられるが、これらに限定されない。

中でも、検出可能に標識した本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体と、サンプル中のがん微小環境を標的としたポドカリキシンの抗原抗体反応を利用してがん微小環境を標的としたポドカリキシンの量を測定するイムノアッセイが好ましい。

[0081] イムノアッセイは、検出可能に標識したがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体、又は、検出可能に標識したがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体に対する抗体（二次抗体）を用いる。抗体の標識法により、エンザイムイムノアッセイ（EIA又はELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、蛍光イムノアッセイ（FIA）、蛍光偏光イムノアッセイ

(F P I A)、化学発光イムノアッセイ (C L I A) 等に分類され、これらのいずれも本発明の方法に用いることができる。

E L I S A法では、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素、R I A法では、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 等の放射性物質、F P I A法では、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ダンシルクロリド、フィコエリトリン、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、近赤外蛍光材料等の蛍光物質、C L I A法では、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、エクオリン等の発光物質で標識した抗体が用いられる。その他、金コロイド、量子ドット等のナノ粒子で標識した抗体を検出することもできる。

また、イムノアッセイでは、がん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体をビオチンで標識し、酵素等で標識したアビジン又はストレプトアビジンを結合させて検出することもできる。

[0082] イムノアッセイの中でも、酵素標識を用いるE L I S A法は、簡便且つ迅速に抗原を測定することができて好ましい。

E L I S A法には競合法とサンドイッチ法がある。競合法では、マイクロプレート等の固相担体にがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体を固定し、サンプルと酵素標識したがん特異的ポドカリキシンを添加して、抗原抗体反応を生じさせる。いったん洗浄した後、酵素基質と反応、発色させ、吸光度を測定する。サンプル中のポドカリキシンが多ければ発色は弱くなり、サンプル中のポドカリキシンが少なければ発色が強くなるので、検量線を用いてポドカリキシン量を求めることができる。

[0083] サンドイッチ法では、固相担体にがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体を固定し、サンプルを添加し、反応させた後、さらに酵素で標識した別のエピトープを認識するがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体を添加して反応させる。洗浄後、酵素基質と反応、発色させ、吸光度を測定することにより、ポドカリキシン量を求めることができる。サンドイッチ法では、固相担体に固定したがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体とサンプル中のがん特異的ポドカリキシンを反応させた後、非標識抗体（

一次抗体)を添加し、この非標識抗体に対する抗体(二次抗体)を酵素標識してさらに添加してもよい。

酵素基質は、酵素がペルオキシダーゼの場合、3,3'-diaminobenzidine (DAB)、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)、o-phenylenediamine (OPD)等を用いることができ、アルカリホスファターゼの場合、p-nitrophenyl phosphate (NPP)等を用いることができる。

[0084] 本明細書において「固相担体」は、抗体を固定できる担体であれば特に限定されず、ガラス製、金属性、樹脂製等のマイクロタイタープレート、基板、ビーズ、ニトロセルロースメンブレン、ナイロンメンブレン、PVDFメンブレン等が挙げられ、標的物質は、これらの固相担体に公知の方法に従って固定することができる。

[0085] また、上記イムノアッセイの中で、微量のタンパク質を簡便に検出できる方法として凝集法も好ましい。凝集法としては、例えば、抗体にラテックス粒子を結合させたラテックス凝集法が挙げられる。

ラテックス粒子にがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体を結合させてサンプルに混合すると、がん特異的ポドカリキシンが存在すれば、抗体結合ラテックス粒子が凝集する。そこで、サンプルに近赤外光を照射して、吸光度の測定(比濁法)又は散乱光の測定(比臈法)により凝集塊を定量し、抗原の濃度を求めることができる。

[0086] 本明細書において「検査」は、診断に必要な情報を得るために、被検者から採取した試料を調べることを意味し、本発明の検査方法は、例えば検査会社等で実施され得る。

[0087] 本発明に係る検査方法の一態様は、被検者のサンプル中のがん特異的ポドカリキシンが、非がん患者のがん特異的ポドカリキシンより多いか否かを分析する工程を含む。非がん患者のサンプルと比較して、被検者のサンプル中のがん特異的ポドカリキシン量が有意に多い場合に、該被検者はがんに罹患

している可能性が高いと判定される。

[0088] 本発明に係る検査方法の一態様は、がんの治療を受けた後の患者のサンプル中のがん特異的ポドカリキシンを経時的に測定し、がん特異的ポドカリキシン量の変動を分析する工程を含む。ポドカリキシン量を経時的に増加する傾向にある場合、当該患者におけるがんの再発又は転移の可能性が高いと判定される。

[0089] 本発明は、本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体を含むがんの診断薬、がんの診断のための本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体の使用、本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体を用いるがんの診断方法をも包含する。本明細書において「診断」とは、医師等の医療行為者が、被検者ががん罹患している可能性や、がんが再発、転移している可能性を判断することを意味する。

[0090] [がんの検査用キット]

本発明に係るがんの検査用キットは、上述した検査方法を使用してがんの検査を行うためのキットであり、がん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体を含む。

本発明に係る検査用キットは、がん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体とがん特異的ポドカリキシンとの抗原抗体反応を利用するイムノアッセイによって、ポドカリキシン量を測定するために必要な試薬や装置を含む。

[0091] 検査用キットの一態様は、サンドイッチ法によってがん特異的ポドカリキシンを測定するためのものであり、マイクロタイタープレート；捕捉用のがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体；アルカリホスファターゼ又はペルオキシダーゼで標識したがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体；及び、アルカリホスファターゼ基質（NPP等）又はペルオキシダーゼの基質（DAB、TMB、OPD等）、を含む。

捕獲抗体と標識抗体は、異なるエピトープを認識する。

このようなキットでは、まず、マイクロタイタープレートに捕獲抗体を固

定し、ここにサンプルを適宜希釈して添加した後インキュベートし、サンプルを除去して洗浄する。次に、標識した抗体を添加した後インキュベートし、基質を加えて発色させる。マイクロタイタープレートリーダー等を用いて発色を測定することにより、がん特異的ポドカリキシン量を求めることができる。

[0092] 検査用キットの別の態様は、二次抗体を使用してサンドイッチ法によりがん特異的ポドカリキシンを測定するためのものであり、マイクロタイタープレート；捕捉用のがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体；一次抗体として、がん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体；二次抗体として、アルカリホスファターゼ又はペルオキシダーゼで標識した、がん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体；及び、アルカリホスファターゼ（NPP等）又はペルオキシダーゼの基質（DAB、TMB、OPD等）、を含む。

捕獲抗体と一次抗体は、異なるエピトープを認識する。

このようなキットでは、まず、マイクロタイタープレートに捕獲抗体を固定し、ここにサンプルを適宜希釈して添加した後インキュベートし、サンプルを除去して洗浄する。続いて、一次抗体を添加してインキュベート及び洗浄を行い、さらに酵素標識した二次抗体を添加してインキュベートを行った後、基質を加えて発色させる。マイクロタイタープレートリーダー等を用いて発色を測定することにより、がん特異的ポドカリキシン量を求めることができる。二次抗体を用いることにより、反応が増幅され検出感度を高めることができる。

[0093] また、検査用キットの別の態様は、マイクロタイタープレート；一次抗体としてのがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体；アルカリホスファターゼ又はペルオキシダーゼで標識した、がん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体；及び、アルカリホスファターゼ又はペルオキシダーゼの基質、を含む。

かかるキットによれば、まず、適当な濃度に希釈したサンプルでマイクロ

タイタープレートをコーティングし、一次抗体を添加する。インキュベート及び洗浄を行った後、酵素標識した二次抗体を添加し、インキュベート及び洗浄を行い、基質を加えて発色させる。

マイクロタイタープレートリーダー等を用いて発色を測定することにより、がん特異的ポドカリキシン量を求めることができる。

[0094] 各検査用キットは、さらに、必要な緩衝液、酵素反応停止液、マイクロプレートリーダー等を含むことも好ましい。

[0095] 標識抗体は、酵素標識した抗体に限定されず、放射性物質（ ^{251}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 等）、蛍光物質（フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ダンシルクロリド、フィコエリトリン、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、近赤外蛍光材料等）、発光物質（ルシフェラーゼ、ルシフェリン、エクオリン等）、ナノ粒子（金コロイド、量子ドット）等で標識した抗体であってもよい。また標識抗体としてビオチン化抗体を用い、キットに標識したアビジン又はストレプトアビジンを加えることもできる。

[0096] 本発明に係る検査用キットのさらに別の態様として、ラテックス凝集法によってがん特異的ポドカリキシンを測定するためのものも挙げられる。このキットは、がん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体感作ラテックスを含み、サンプルとがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体とを混合し、光学的方法で集塊を定量する。キットに凝集反応を可視化する凝集反応板が含まれていることも好ましい。

[0097] 本発明に係る検査用キットは、診断用キットとして用いることもできる。なお、本発明に係るがんの検査方法、診断方法、がんの検査用キット、診断用キットには、本発明に係るがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体に代えて、その抗原結合フラグメントを用いてもよい。

[0098] 本明細書において引用されるすべての特許文献及び非特許文献の開示は、全体として本明細書に参照により組み込まれる。

実施例

[0099] 以下、本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、本発明は何らこれ

に限定されるものではない。当業者は、本発明の意義を逸脱することなく様々な態様に本発明を変更することができ、かかる変更も本発明の範囲に含まれる。

[0100] 1、抗ポドカリキシン抗体の作製

ヒト膠芽腫細胞株であるLN229細胞（ATCCから購入）を用いてヒトポドカリキシンの細胞外領域（配列番号1における26番目から426番目のアミノ酸）をリポフェクション法（ライフテクノロジー社）にて導入し、G418（ライフテクノロジー社）による薬剤選抜を行って分泌型ヒトポドカリキシンの安定発現株（LN229/sol-hPODXL）を樹立した。分泌型ヒトポドカリキシンのC末端には、発明者らが開発したP A t a g（Fujii Y et al., Protein Expr Purif. 2014; 95: 240-247.）を付加した。LN229/sol-hPODXLを10%ウシ胎児血清（FBS;ライフテクノロジー社）を添加したDMEM培地（和光純薬株式会社）で大量培養し、その上清を回収した。回収した上清を0.22 μ mフィルター（ミリポア社）でろ過し、P A t a gシステムを用いて分泌型ポドカリキシンの精製を行った。分泌型ポドカリキシンの溶出には、0.1mg/mLのP A t a gペプチド（hpp4051:12アミノ酸のペプチド）を用いた。吸光度OD280をナンドロップライト（サーモサイエンティフィック社）を用いて計測した。

[0101] 精製した分泌型ポドカリキシンを、Balb/cマウス（メス、4週齢;クレア社）に、以下のスケジュールで免疫した。

1回目の免疫として、分泌型ポドカリキシンの100 μ gを0.5mLのPBSで懸濁したものを、アジュバントとしての0.5mLのImject Alum（サーモサイエンティフィック社）と混合して腹腔投与した。

2回目の免疫として、分泌型ポドカリキシンの100 μ gとLN229/hPODXLの 1×10^7 細胞を0.5mLのPBSで懸濁したものを腹腔投与した。

3～5回目の免疫として、LN229/hPODXLの 1×10^7 細胞を0.5 mLのPBSで懸濁したものを腹腔投与した。

最終免疫から48時間後に、免疫したマウスから脾臓を採取し、脾細胞を抽出した。脾細胞はマウスミエローマのP3U1細胞(ATCCから購入)とポリエチレングリコール1,500(シグマアルドリッチ社)を用いて融合させ、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン(HAT;サーモサイエンティフィック社)を添加した10%FBS/RPMI培地(和光純薬株式会社)を用いて、10日間培養を行った。分泌した抗体について、ELISA法による一次スクリーニングを行った。

[0102] ELISAの抗原として、分泌型ヒトポドカリキシンを固相化した。分泌型ヒトポドカリキシンを $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ でマキシソープ(サーモサイエンティフィック社)へ固相化し、ブロッキングは1%BSA/PBSで行った。ハイブリドーマ培養上清を一次抗体液とし、anti-mouse IgG-HRP(ダコ社)を二次抗体液とした。抗原抗体反応は全て室温で行い、プレート洗浄は0.05%Tween-20を含むPBSで行った。検出は1-Step Ultra TMB-ELISA(サーモサイエンティフィック社)を使用し、655 nmの吸光度をマイクロプレートリーダー(バイオラッド社)にて測定した。

[0103] 2. フローサイトメトリー

二次スクリーニングには内在的にヒトポドカリキシンの発現しているLN229細胞、及びLN229細胞にヒトポドカリキシンを強制発現させた細胞(ポドカリキシン強制発現LN229細胞)を用いて反応性を検討した。樹立したモノクローナル抗体の評価には、LN229細胞、ポドカリキシン強制発現LN229細胞、血管内皮細胞株(Cambrex社より購入)を用いた。1反応あたり 1×10^5 細胞を使用した。細胞に培養上清を添加し、氷上で1時間、一次抗体反応を行った。0.1%BSA/PBSで洗浄した後、Alexa488標識抗マウスIgG抗体(1/1,000希釈、サーモサイエンティフィック社)を添加し、氷上で30分、二次抗体反応を行っ

た。0.1%BSA/PBSで洗浄した後、Cell Analyzer EC800 (ソニー社)で解析を行った。

ポドカリキシン強制発現LN229細胞に反応し、血管内皮細胞に反応しない一次抗体を樹立した。

[0104] 3. 免疫組織染色

乳がん組織や正常組織(ヒト腎臓、ヒト小腸)のパラフィン切片を、キシレンとエタノールの系列を使って脱パラフィンした。pH6.0のクエン酸バッファー(ダコ社)を用いて、オートクレーブにより抗原賦活化を行った。3% H_2O_2 を用いて内在性のペルオキシダーゼを不活性化した。SuperBlock(サーモフィッシャー社)を用いて、室温で10分間、ブロッキングを行い、一次抗体を $1\mu g/mL$ の濃度で室温で1時間反応させた。Envision+ (ダコ社)で増幅後、DAB(ダコ社)で発色した。腎臓の正常血管及び糸球体並びに小腸の正常血管が染色されず、乳がん組織のがん細胞周辺の異常血管が染色されたクローン(PcMab-60)を樹立した。

[0105] 4. PcMab-60のアミノ酸配列及び塩基配列の決定

PcMab-60ハイブリドーマ細胞 1×10^6 からQIAGEN RNeasy mini kitを使用してトータルRNAを抽出した。トータルRNA $5\mu g$ からSuperScript III First-Strand Syntheses kitを使用してcDNA合成を行った。以下の実験にcDNAを鋳型として使用した。

[0106] ヒトキメラ型PcMab-60(chPcMab-60)を作製するために、PcMab-60のVH領域をコードするDNAをPCRで増幅し、ヒトIgG1のCH1、ヒンジ領域、CH2、CH3領域をコードするDNAを保持したpCAGベクターに組み込んだ(pCAG-hIgG1hG2b/PcMab-60HVH(G418))。また、PcMab-60のVL領域をコードするDNAをPCRで増幅し、pCAGベクターに組み込んだ(pCAG/PcMab-60L(zeocin))。

[0107] 重鎖の増幅に以下のプライマーを使用した。

InFs.HindIII-Pc60H : CGGTATCGATAAGCTTCCAATGTCCTCTCCACAG (配列番号 : 1
2)

InFr.Pc60HVH-BamHI : GGCCCTTGGTGGATCCGACGGTGACTGAGGTTC (配列番号 : 1 3
)

PCR反応にはQIAGEN HotStar HiFidelity DNA polymeraseを使用した。温度条件は、最初に95℃5分、次に94℃15秒、50℃1分、72℃1分を35サイクル、最後に72℃10分とした。増幅したPCR産物はFastGene Gel/PCR Extractionにて精製した。PcMab-60の重鎖PCR産物は、制限酵素HindIII及びNotIにて酵素処理し、FastGene Gel/PCR Extraction kitにて精製したpCAG-hlgG1hG2b vector (G418) にInFusion法を用いてサブクローニングし、ベクタープライマーから塩基配列の確認を行った。

[0108] 軽鎖の増幅に以下のプライマーを使用した。

InFs.HindIII-Pc60L : CGGTATCGATAAGCTTAAAATGATGAGTCCTGCCC (配列番号 : 1
4)

InF.mIgCKterNotI : TCTAGAGTCGCGGCCGCCTAACACTCATTCTGT (配列番号 : 1 5
)

PCR反応にはQIAGEN HotStar HiFidelity DNA polymeraseを使用した。温度条件は、最初に95℃5分、次に94℃15秒、50℃1分、72℃1分を35サイクル、最後に72℃10分とした。増幅したPCR産物はFastGene Gel/PCR Extractionにて精製した。PcMab60の軽鎖PCR産物は、制限酵素HindIII及びNotIにて酵素処理し、FastGene Gel/PCR Extraction kitにて精製したpCAG vector (zeocin) にInFusion法を用いてサブクローニ

ングし、ベクタープライマーから塩基配列の確認を行った。

[0109] *chPcMab-60*の重鎖をコードするDNAの塩基配列は配列番号：11に、*PcMab-60*の軽鎖をコードするDNAの塩基配列は配列番号：9に示すとおりであった。

塩基配列からアミノ酸配列を予測した。*chPcMab-60*の重鎖アミノ酸配列は配列番号：10に、*PcMab-60*の軽鎖アミノ酸配列は配列番号：8に示すとおりであった。

[0110] 5. CDRの決定

決定した塩基配列より以下のURLのホームページ (*abYsis*) に提供されているイムノグロブリンの配列予測ソフトにてCDRの部位を特定した。

(http://www.bioinf.org.uk/abysis/sequence_input/key_annotation/key_annotation.html)

*PcMab-60*の重鎖CDR1~3及び軽鎖CDR1~3のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：2~7に示されるように特定された。

[0111] 6. ヒトキメラ型*PcMab-60* (*chPcMab-60*) の作製

pCAG-hlgG1hG2b/PcMab-60HVH (G418) 及び *pCAG/PcMab-60L* (*zeocin*) は、上記4. で調製したものをを用いた。

pCAG-hlgG1hG2b/PcMab-60HVH (G418) 及び *pCAG/PcMab-60L* (*zeocin*) を、それぞれ2.5 μ gを混合し、*Lipofectamin LTX*の方法に従って、CHO-S細胞 5×10^5 (6ウェルプレートの1ウェルに相当) に形質導入した。24時間後から *zeocin* 500 μ g/mL、G418 1mg/mL入りの培地で形質導入細胞の選択をした。ポドカリキシン強制発現LN229細胞 (LN229/hPODXL) に対して、選択細胞の培養上清の反応性をフローサイトメトリーにて確認した。

[0112] *chPcMab-60*の高発現株を、無血清培地 (サーモフィッシャー社

)を用いて培養し、培養上清を回収した。回収した上清を0.22 μ mフィルター(ミリポア社)でろ過し、プロテインGカラム(GEヘルスケア社)に通し、c h P c M a b - 6 0を精製した。c h P c M a b - 6 0は、配列番号:10で示すアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号:8で示すアミノ酸配列からなる軽鎖で構成されている。重鎖をコードするDNAの塩基配列を配列番号:11に、軽鎖をコードするDNAの塩基配列を配列番号:9に示す。

c h P c M a b - 6 0の重鎖は、P c M a b - 6 0のVH領域と、ヒトI g G 1に由来するCH1、ヒンジ領域、CH2、CH3からなる。

[0113] 7. ポドカリキシンに対する抗ポドカリキシン抗体の反応性

P c M a b - 6 0及びc h P c M a b - 6 0が、濃度依存的にポドカリキシンに対して反応を示すことを確認した。LN229(ATCCより購入)、ヒトポドカリキシン強制発現LN229細胞(LN229/hPODXL)、血管内皮細胞株(Cambrex社より購入)を用いた。1反応あたり 1×10^5 細胞を使用した。細胞に0.01~10 μ g/mLの濃度の精製抗ポドカリキシン抗体を添加し、氷上で1時間、一次抗体反応を行った。0.1%BSA/PBSで洗浄した後、FITC標識抗ヒトI g G抗体(1/1,000希釈;サーモフィッシャー社)を添加し、氷上で30分、二次抗体反応を行った。0.1%BSA/PBSで洗浄した後、Cell Analyzer EC800(ソニー社)で解析を行った。結果を図1及び図2に示す。図1及び図2の結果から、今回得られたP c M a b - 6 0及びc h P c M a b - 6 0は、いずれもLN229に対しては反応しないが、ヒトポドカリキシンの強制発現のLN229/hPODXLには濃度依存的に反応した。

[0114] 8. P c M a b - 4 7の作製

ヒト脳腫瘍細胞株のLN229細胞(ATCCから購入)を用いてヒトポドカリキシンの細胞外領域(配列番号1における26番目から426番目のアミノ酸)をリポフェクション法(ライフテクノロジー社)にて導入し、G

418による薬剤選抜を行って分泌型ヒトポドカリキシンの安定発現株（LN229／sol-hPODXL）を樹立した。分泌型ヒトポドカリキシンのC末端には、発明者らが開発したPA tag（Fujii Y et al., Protein Expr Purif. 2014; 95: 240-247.）を付加した。LN229／sol-hPODXLを10%ウシ胎児血清（FBS；ライフテクノロジー社）を添加したDMEM培地（和光純薬株式会社）で大量培養し、その上清を回収した。回収した上清を0.22 μ mフィルター（ミリポア社）でろ過し、PA tagシステムを用いて分泌型ポドカリキシンの精製を行った。分泌型ポドカリキシンの溶出には、0.1mg/mLのPA tagペプチド（hpp4051:12アミノ酸のペプチド）を用いた。吸光度OD280をナドロップライト（サーモサイエンティフィック社）を用いて計測した。

[0115] 精製した分泌型ポドカリキシンを、Balb/cマウス（メス、5週齢；クレア社）に免疫した。1回あたり100 μ gを0.5mLのPBSで懸濁したものを腹腔投与し、7～14日の間隔をおいて5回免疫を行った。1回目の免疫のみ、アジュバントとして0.5mLのImject Alum（サーモサイエンティフィック社）と混合して免疫を行った。最終免疫から48時間後に、免疫したマウスから脾臓を採取し、脾細胞を抽出した。脾細胞はマウスミエローマのP3U1細胞（ATCCから購入）とポリエチレングリコール1,500（シグマアルドリッチ社）を用いて融合させ、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン（HAT；ライフテクノロジー社）を添加した10%FBS/RPMI培地（和光純薬株式会社）を用いて、10日間培養を行った。分泌した抗体について、ELISA法による一次スクリーニングを行った。

[0116] ELISAの抗原として、分泌型ヒトポドカリキシンを固相化した。分泌型ヒトポドカリキシンを1 μ g/mLでマキシソープ（サーモサイエンティフィック社）へ固相化し、ブロッキングは1%BSA/PBSで行った。ハイブリドーマ培養上清を一次抗体液とし、anti-mouse IgG-

HRP（ダコ社）を二次抗体液とした。抗原抗体反応は全て室温で行い、プレート洗浄は0.05% Tween-20を含むPBSで行った。検出は1-Step Ultra TMB-ELISA（サーモサイエンティフィック社）を使用し、655nmの吸光度をマイクロプレートリーダー（バイオラッド社）にて測定した。

[0117] 二次スクリーニングには内在的にヒトポドカリキシンの発現しているLN229細胞、及びLN229細胞にヒトポドカリキシンを強制発現させた細胞を用いて反応性を検討した。樹立したモノクローナル抗体の評価には上記細胞の他に、膠芽腫細胞株LN229（ATCCより購入）、乳がん細胞株MCF-7（ATCCより購入）、骨肉腫細胞株U2-OS（ATCCより購入）、血管内皮細胞株（Cambrex社より購入）を用いた。1反応あたり 1×10^5 細胞を使用した。細胞に培養上清を添加し、氷上で1時間、一次抗体を $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で反応させた。0.1%BSA/PBSで洗浄した後、Alexa488標識抗マウスIgG抗体（1/1,000希釈、ライフテクノロジー社）を添加し、氷上で30分、二次抗体反応を行った。0.1%BSA/PBSで洗浄した後、Cell Analyzer EC800（ソニー社）で解析を行った。各種がん細胞株及び血管内皮細胞に反応するクローン（PcMab-47）を樹立した。

[0118] 2種類の正常血管内皮細胞に対する、PcMab-47及びPcMab-60のフローサイトメトリーの結果を図3に示す。ロットが違う別の正常血管内皮細胞に対して、PcMab-47は濃度依存的に反応するが、PcMab-60は正常血管内皮細胞に反応しなかった。すなわち、PcMab-60は、ドナー特異的ではなく、正常血管内皮細胞に反応しないことが確認できた。

また、PcMab-47及びPcMab-60の正常組織及び乳がん組織に対する免疫組織染色の結果を図4に示す。図4の結果から、PcMab-60は、がん微小環境の異常血管に対してのみ反応性が見られることがわかった。

[0119] P c M a b - 4 7 は、がん細胞に発現するポドカリキシンのみならず、正常血管やがん微小環境の異常血管にも良好な反応性を示した。一方、実施例で作製した P c M a b - 6 0 は、正常の血管内皮細胞や腎糸球体には全く反応せず、乳がん組織の微小環境に見られる異常血管のみに反応した。

正常血管には反応せず、がん微小環境の異常血管のみに特異的に反応する抗体は、これまで報告がなく、がん微小環境を標的とした、新規な抗ポドカリキン抗体である P c M a b - 6 0 が樹立できた。今回作製した P c M a b - 6 0 に抗がん剤や標的アイソトープなどを結合させ、がん患者に投与することにより、がん微小環境の異常血管に抗がん剤や標的アイソトープを選択的に運ぶことができる。現在、がん細胞のみを狙った治療は効果が限定的であることが指摘されており、今後、がん微小環境を狙った治療は、がん分子標的治療において重要な戦略となる。

産業上の利用可能性

[0120] 本発明のがん微小環境を標的とした抗ポドカリキン抗体は、抗体医薬として産業上の利用可能性を有する。

配列表フリーテキスト

[0121] 配列番号：1 は、ヒトポドカリキシンのアミノ酸配列を表す。

配列番号：2～4 は、それぞれ c h P c M a b - 6 0 の重鎖 C D R 1～3 のアミノ酸配列を表す。

配列番号：5～7 は、それぞれ P c M a b - 6 0 の軽鎖 C D R 1～3 のアミノ酸配列を表す。

配列番号：8、9 は、それぞれ P c M a b - 6 0 の軽鎖のアミノ酸配列と D N A 配列を表す。

配列番号：10、11 は、それぞれ c h P c M a b - 6 0 の重鎖のアミノ酸配列と D N A 配列を表す。

配列番号：12 は、プライマー InFs.HindIII-Pc60H の D N A 配列を表す。

配列番号：13 は、プライマー InFr.Pc60HVH-BamHI の D N A 配列を表す。

配列番号：14 は、プライマー InFs.HindIII-Pc60L の D N A 配列を表す。

配列番号：15は、プライマーInF.mIgCKterNotIのDNA配列を表す。

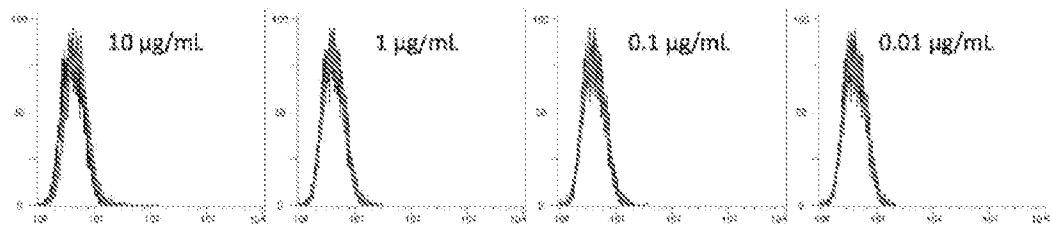
請求の範囲

- [請求項1] 以下 (i) ~ (iii) のいずれかのがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメント：
- (i) 以下の6つのCDRの少なくとも1つを有する
- 重鎖CDR1：GYSFTDY（配列番号：2）
- 重鎖CDR2：NPRNGG（配列番号：3）
- 重鎖CDR3：EAMEY（配列番号：4）
- 軽鎖CDR1：KSSQSLLDSAGKTYLN（配列番号：5）
- 軽鎖CDR2：RLMYLVSKLA（配列番号：6）
- 軽鎖CDR3：WQGTHFPRT（配列番号：7）；
- (ii) (i) の重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3において、1から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含む重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3の少なくとも1つを有する；並びに
- (iii) 重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3の少なくとも1つが、(i) の重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。
- [請求項2] 配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含む重鎖；
- 配列番号：10で表されるアミノ酸配列において、1から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含むアミノ酸配列を含む重鎖；又は、
- 配列番号：10で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖を含むがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメント。
- [請求項3] 配列番号：8で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖；
- 配列番号：8で表されるアミノ酸配列において、1から数個のアミノ酸の付加、置換、又は欠失を含むアミノ酸配列を含む軽鎖；又は、
- 配列番号：8で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有す

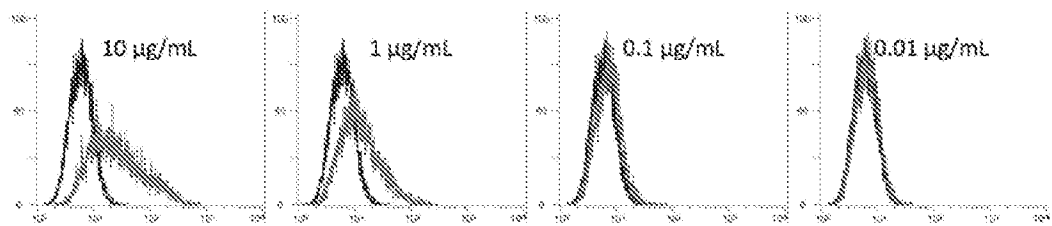
るアミノ酸配列を含む軽鎖を含むがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメント。

- [請求項4] Fc領域に1以上のN-結合型糖鎖が結合し、該N-結合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない、請求項1から3のいずれか1項に記載のがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメント。
- [請求項5] 請求項1に記載された重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のいずれか1つをコードする核酸。
- [請求項6] 請求項2に記載された重鎖及び請求項3に記載された軽鎖のいずれか1つをコードする核酸。
- [請求項7] 請求項5又は6に記載の核酸を含む発現ベクター。
- [請求項8] 請求項7に記載の発現ベクターを含む形質転換体。
- [請求項9] 請求項1から4のいずれか1項に記載のがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメントを有効成分として含む医薬組成物。
- [請求項10] 抗がん活性を有する物質を結合させた請求項1から4のいずれか1項に記載のがん微小環境を標的とした抗ポドカリキシン抗体又はその抗原結合フラグメントを有効成分として含む医薬組成物。
- [請求項11] がんの予防又は治療剤である、請求項9又は10に記載の医薬組成物。

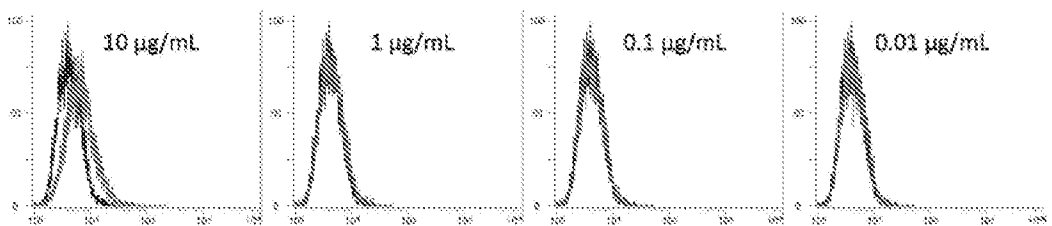
[図1]
1A



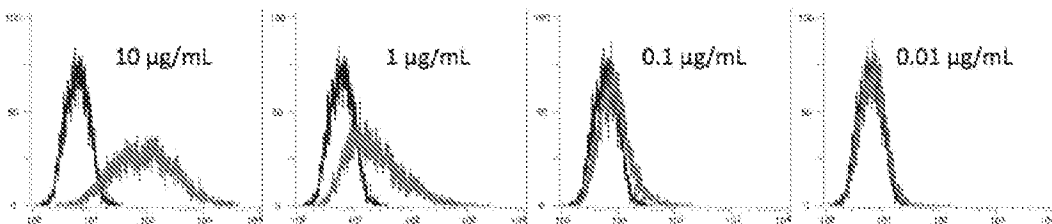
1B



[図2]
2A

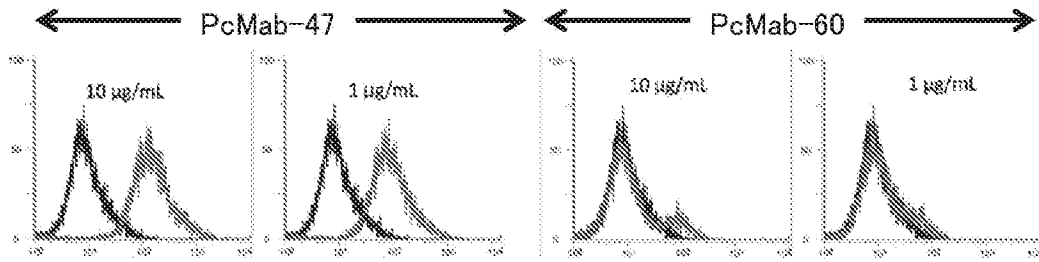


2B

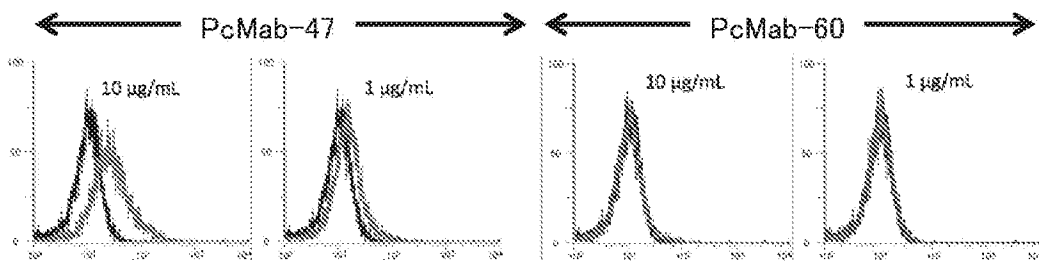


[図3]

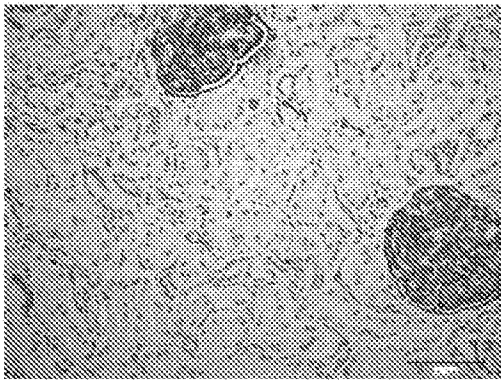
3A



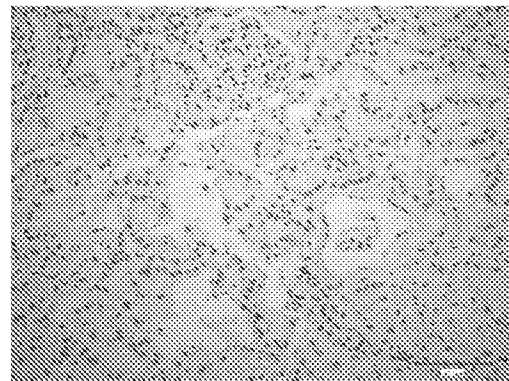
3B



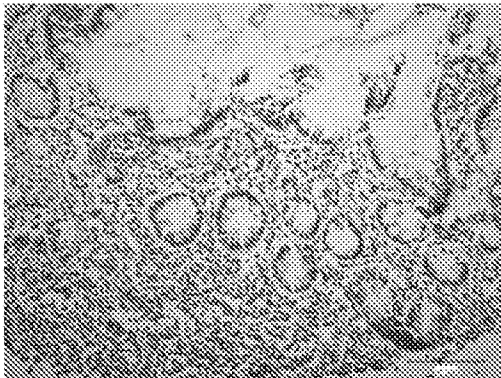
[図4]

PcMab-47 (1 μ g/ml)

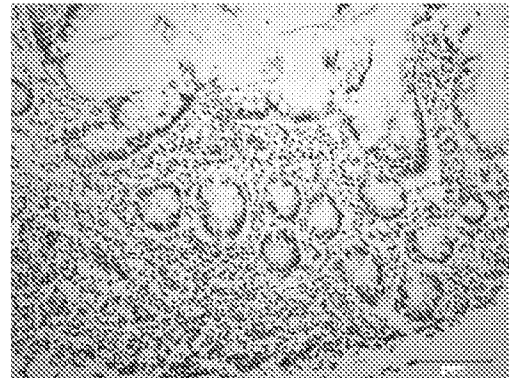
4A

PcMab-60 (1 μ g/ml)

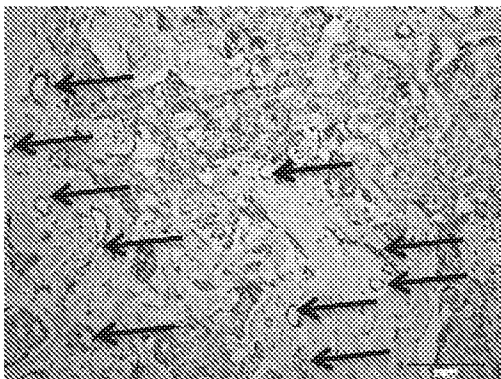
4B



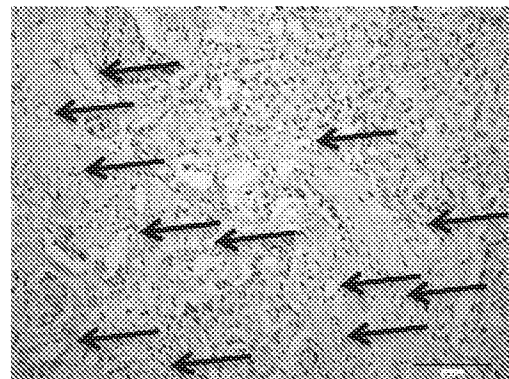
4C



4D



4E



4F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/060822

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K16/32(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K16/32, A61K39/395, A61P35/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX/FROSTI/FSTA(STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMIII), GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ, UNIPROT/GENESEQ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2015/058301 A1 (THE CENTRE FOR DRUG RESEARCH AND DEVELOPMENT), 30 April 2015 (30.04.2015), particularly, claims; examples (Family: none)	<u>1, 5, 7-9, 11</u> 1-11
X Y	SNYDER Kimberly A et al., Podocalyxin enhances breast tumor growth and metastasis and is a target for monoclonal antibody therapy, Breast Cancer Research, 2015, Vol.17, No.46, p.1-14, particularly, abstract, table 1, fig. 6, conclusive words	<u>1, 9, 11</u> 1-11

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 20 June 2016 (20.06.16)	Date of mailing of the international search report 28 June 2016 (28.06.16)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/060822

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>Y</u>	JP 2016-508219 A (Atlas Antibodies AB), 17 March 2016 (17.03.2016), particularly, claims; examples & US 2015/0309030 A1 & WO 2014/095508 A1 & EP 2746768 A1 particularly, claims; examples	<u>1</u> 1-11
<u>X</u> <u>Y</u>	TESTA Jacqueline E. et al., Ubiquitous yet Distinct Expression of Podocalyxin on Vascular Surfaces in Normal and Tumor Tissues in the Rat, J Vasc Res, 2009, Vol.46, p.311-324, particularly, abstract, fig. 10	<u>1</u> 1-11
<u>X</u> <u>Y</u>	SCHOPPERLE W. Michael et al., Human embryonal carcinoma tumor antigen, Gp200/GCTM-2, is podocalyxin, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, Vol.300, p.285- 290, particularly, abstract, fig. 5, page 288, right column	<u>1</u> 1-11
Y	BUGANIM Yosef et al., Transcriptional activity of ATF3 in the stromal compartment of tumors promotes cancer progression, Carcinogenesis, 2011, Vol.32, No.12, p.1749-1757, particularly, abstract, fig. 5	1-11
Y	WO 2016/013597 A1 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 28 January 2016 (28.01.2016), particularly, paragraph [0019] (Family: none)	1-11
Y	BARDERAS Rodrigo et al., In-depth Characterization of the Secretome of Colorectal Cancer Metastatic Cells Identifies Key Proteins in Cell Adhesion, Migration, and Invasion, Molecular & Cellular Proteomics, 2013, p.1602- 1620, particularly, abstract, table 1	1-11
Y	Satoshi OGASAWARA et al., "Podoplanin ni Taisuru Gan Tokuiteki Kotai (CasMab) no Kaihatsu", Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, 2014, vol.87th, 4T13a-14, page 222, entire text	1-11
Y	WO 02/031140 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 18 April 2002 (18.04.2002), particularly, claims; examples & EP 1331266 A1 & KR 10-0877676 B1 & CN 102311986 A & US 2003/0115614 A1 particularly, claims; examples	1-11

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C07K16/32(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i</p>												
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C07K16/32, A61K39/395, A61P35/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09</p>												
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:30%;">日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2016年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2016年	日本国実用新案登録公報	1996-2016年	日本国登録実用新案公報	1994-2016年	
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2016年											
日本国実用新案登録公報	1996-2016年											
日本国登録実用新案公報	1994-2016年											
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX/FROSTI/FSTA(STN), JSTplus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%;">引用文献の カテゴリー*</th> <th style="width:70%;">引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th style="width:20%;">関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align:center;">X Y</td> <td>WO 2015/058301 A1 (THE CENTRE FOR DRUG RESEARCH AND DEVELOPMENT) 2015.04.30, 特に [特許請求の範囲] [実施例] (ファミリーなし)</td> <td style="text-align:center;">1, 5, 7-9, 11 1-11</td> </tr> <tr> <td style="text-align:center;">X Y</td> <td>SNYDER Kimberly A et al., Podocalyxin enhances breast tumor growth and metastasis and is a target for monoclonal antibody therapy, Breast Cancer Research, 2015, Vol.17, No.46, p.1-14, 特に要約・表1・図6・結語</td> <td style="text-align:center;">1, 9, 11 1-11</td> </tr> </tbody> </table>				引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X Y	WO 2015/058301 A1 (THE CENTRE FOR DRUG RESEARCH AND DEVELOPMENT) 2015.04.30, 特に [特許請求の範囲] [実施例] (ファミリーなし)	1, 5, 7-9, 11 1-11	X Y	SNYDER Kimberly A et al., Podocalyxin enhances breast tumor growth and metastasis and is a target for monoclonal antibody therapy, Breast Cancer Research, 2015, Vol.17, No.46, p.1-14, 特に要約・表1・図6・結語	1, 9, 11 1-11
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号										
X Y	WO 2015/058301 A1 (THE CENTRE FOR DRUG RESEARCH AND DEVELOPMENT) 2015.04.30, 特に [特許請求の範囲] [実施例] (ファミリーなし)	1, 5, 7-9, 11 1-11										
X Y	SNYDER Kimberly A et al., Podocalyxin enhances breast tumor growth and metastasis and is a target for monoclonal antibody therapy, Breast Cancer Research, 2015, Vol.17, No.46, p.1-14, 特に要約・表1・図6・結語	1, 9, 11 1-11										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。</p>		<p><input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>		<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p>										
<p>国際調査を完了した日</p> <p style="text-align:center;">20.06.2016</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p style="text-align:center;">28.06.2016</p>										
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p style="text-align:center;">日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p style="text-align:center;">原 大樹</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3488</p>										

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	JP 2016-508219 A (アトラス・アンティボディーズ・アクチボラゲ ット) 2016.03.17, 特に [特許請求の範囲] [実施例] & US 2015/0309030 A1 & WO 2014/095508 A1 & EP 2746768 A1, 特 特に [特許請求の範囲] [実施例]	1 1-11
X Y	TESTA Jacqueline E. et al., Ubiquitous yet Distinct Expression of Podocalyxin on Vascular Surfaces in Normal and Tumor Tissues in the Rat, J Vasc Res, 2009, Vol. 46, p. 311-324, 特に要約・図 10	1 1-11
X Y	SCHOPPERLE W. Michael et al., Human embryonal carcinoma tumor antigen, Gp200/GCTM-2, is podocalyxin, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, Vol. 300, p. 285-290, 特に要約・図 5・288 頁右欄	1 1-11
Y	BUGANIM Yosef et al., Transcriptional activity of ATF3 in the stromal compartment of tumors promotes cancer progression, Carcinogenesis, 2011, Vol. 32, No. 12, p. 1749-1757, 特に要約・ 図 5	1-11
Y	WO 2016/013597 A1 (国立研究開発法人産業技術総合研究所) 2016.01.28, 特に [0019] (ファミリーなし)	1-11
Y	BARDERAS Rodrigo et al., In-depth Characterization of the Secretome of Colorectal Cancer Metastatic Cells Identifies Key Proteins in Cell Adhesion, Migration, and Invasion, Molecular & Cellular Proteomics, 2013, p. 1602-1620, 特に要約・ 表 1	1-11
Y	小笠原諭他, ポドプラニンに対するがん特異的抗体(CasMab)の開 発, 日本生化学会大会, 2014, Vol. 87th, 4T13a-14, p. 222, 全文	1-11
Y	WO 02/031140 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2002.04.18, 特に [特許 請求の範囲] [実施例] & EP 1331266 A1 & KR 10-0877676 B1 & CN 102311986 A & US 2003/0115614 A1, 特に [特許請求の範囲] [実施例]	1-11