(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2012-505650
(P2012-505650A)
(43)公表日　平成24年3月8日(2012.3.8)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C07K 16/30	(2006.01)	C07K	16/30		4B064
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08		4B065
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4C084
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4C085

審査請求 有　予備審査請求 未請求　（全 41 頁）　最終頁に続く

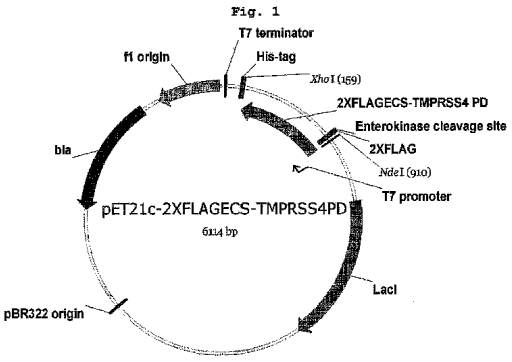
(21)出願番号　特願2011-532001 (P2011-532001)
(86)(22)出願日　平成20年11月10日 (2008.11.10)
(85)翻訳文提出日　平成23年5月23日 (2011.5.23)
(86)国際出願番号　PCT/KR2008/006614
(87)国際公開番号　WO2010/044506
(87)国際公開日　平成22年4月22日 (2010.4.22)
(31)優先権主張番号　10-2008-0101575
(32)優先日　平成20年10月16日 (2008.10.16)
(33)優先権主張国　韓国 (KR)

(71)出願人　508139457
コリア　リサーチ　インスティテュート　オブ　バイオサイエンス　アンド　バイオテクノロジー
大韓民国　テジョン　ユソン－グ　クァンハンノ　１１１
(74)代理人　110000796
特許業務法人三枝国際特許事務所
(72)発明者　パク　ヨンウ
大韓民国　３０５－７６２　テジョン　ユソン－グ　ジョンミン－ドン　エキスポアパートメント　＃５０６－１０４

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＴＭＰＲＳＳ４―特異的なヒト抗体

(57)【要約】
本発明のＴＭＰＲＳＳ４（Ｔｒａｎｓｍｅｍｂｒａｎｅ　ｐｒｏｔｅａｓｅ，ｓｅｒｉｎｅ４）－特異的なヒト抗体に関するもので、詳細には、ＴＭＰＲＳＳ４に特異的に結合するヒトから誘導された相補性決定領域（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ　ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ　ｒｅｇｉｏｎ，ＣＤＲ）とフレームワーク領域（ｆｒａｍｅｗｏｒｋ　ｒｅｇｉｏｎ，ＦＲ）で構成されたヒト抗体に関するものである。本発明の多くの種類の癌細胞で発現するＴＭＰＲＳＳ４に特異的なヒト抗体は、前記癌の診断、疾患の分類、映像化、治療及び予後判定などに用いることができる。
【選択図】図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号７～１８からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域（以下、ＨＣＤＲ）１、配列番号１９～３１からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ２及び配列番号３２～４４からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ３を含む重鎖可変領域（V_H）を含む重鎖またはその断片、及び、
配列番号５８～７０からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有する軽鎖相補性決定領域（以下、ＬＣＤＲ）１、配列番号７１～８３からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ２及び配列番号８４～９６からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（V_L）を含む軽鎖またはその断片を含むＴＭＰＲＳＳ４に特異的なヒト抗体。
【請求項２】
前記重鎖可変領域が、配列番号４５～５７からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有することを特徴とする、請求項１に記載のヒト抗体。
【請求項３】
前記軽鎖可変領域が、配列番号９７～１０９からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有することを特徴とする、請求項１に記載のヒト抗体。
【請求項４】
請求項１に記載のヒト抗体の重鎖またはその免疫学的に活性を有した断片をコーディングするポリヌクレオチド。
【請求項５】
請求項１に記載のヒト抗体の軽鎖またはその免疫学的に活性を有した断片をコーディングするポリヌクレオチド。
【請求項６】
請求項４に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。
【請求項７】
請求項５に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。
【請求項８】
請求項６に記載の発現ベクターを宿主細胞に導入して製造された形質転換体。
【請求項９】
請求項７に記載の発現ベクターを宿主細胞に導入して製造された形質転換体。
【請求項１０】
請求項６および請求項７に記載の発現ベクターを同時に宿主細胞に導入して製造された形質転換体。
【請求項１１】
１）請求項１０に記載の形質転換体を培養する工程、及び
２）前記培養液から請求項１のヒト抗体を精製する工程を含むＴＭＰＲＳＳ４に特異的なヒト抗体の製造方法。
【請求項１２】
請求項１に記載のヒト抗体を含む組成物。
【請求項１３】
請求項１に記載のヒト抗体を含む薬学的組成物。
【請求項１４】
ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌の予防及び治療に用いることを特徴とする、請求項１３に記載の薬学的組成物。
【請求項１５】
ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌が、大腸癌、肺癌、肝臓癌、膵臓癌、胃癌及び悪性甲状腺腫瘍からなる群から選択されることを特徴とする、請求項１４に記載の薬学的組成物。

【請求項１６】
化学的療法と並行して投与することを特徴とする、請求項１３に記載の薬学的組成物。
【請求項１７】
薬学的に有効な量の請求項１に記載のヒト抗体をＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌にかかった個体に投与する工程を含むＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌の治療方法。
【請求項１８】
ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌が、大腸癌、肺癌、肝臓癌、膵臓癌、胃癌及び悪性甲状腺腫瘍からなる群から選択されることを特徴とする、請求項１７に記載の癌の治療方法。
【請求項１９】
請求項１に記載のヒト抗体、前記ヒト抗体の軽鎖または重鎖、またはその免疫学的に活性を有した断片及び放射性同位元素を含む組成物。
【請求項２０】
ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌の放射線免疫治療用及び検出用に用いることを特徴とする、請求項１９に記載の組成物。
【請求項２１】
ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌が、大腸癌、肺癌、肝臓癌、膵臓癌、胃癌及び悪性甲状腺腫瘍からなる群から選択されることを特徴とする、請求項２０に記載の組成物。
【請求項２２】
前記治療用放射性同位元素が、^{3}Ｈ、^{11}Ｃ、^{14}Ｃ、^{18}Ｆ、^{64}Ｃｕ、^{76}Ｂｒ、^{86}Ｙ、^{99m}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{123}Ｉ、^{177}Ｌｕ及びこれらの混合物及び組み合わせからなる群から選択されることを特徴とする、請求項１９に記載の癌の検出用組成物。
【請求項２３】
前記治療用放射性同位元素が、ヒト抗体と結合されるかヒト抗体が結合された運搬体に含まれることを特徴とする、請求項１９～請求項２２のいずれか一項に記載の薬学的組成物。
【請求項２４】
請求項１９に記載の組成物を癌細胞と接触させる工程を含む試験管内のＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌の免疫検出方法。
【請求項２５】
１）請求項１９に記載の組成物の診断的有効量を個体に投与する工程、及び、
２）前記個体に対する検出映像を収得する工程を含む生体内ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌の映像化方法。
【請求項２６】
ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌が、大腸癌、肺癌、肝臓癌、膵臓癌、胃癌及び悪性甲状腺腫瘍からなる群から選択されることを特徴とする、請求項２５に記載の癌の映像化方法。
【請求項２７】
前記検出映像が、近赤外光イメージング、ＰＥＴ、ＭＲＩまたは超音波イメージングによって収得されることを特徴とする、請求項２５に記載の映像化方法。
【請求項２８】
１）請求項２１に記載の検出用組成物を個体の静脈内投与する工程と、
２）前記工程１）の組成物を検出して腫瘍細胞を確認する工程、および
３）前記工程２）で確認された腫瘍細胞を手術的切除によって除去する工程とを含むＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌の生体内治療方法。
【請求項２９】
ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌が、大腸癌、肺癌、肝臓癌、膵臓癌、胃癌及び悪性甲状腺腫瘍からなる群から選択されることを特徴とする、請求項２８に記載の癌の生体内治療方法。

【請求項３０】
１）請求項１９に記載の組成物を大腸癌腫瘍細胞が除去された患者の静脈内に投与する工程と、
２）前記工程１）の組成物を検出して腫瘍細胞を確認する工程、および
３）工程２）で腫瘍細胞が検出されなければ、腫瘍細胞がすべて除去されたと判断することを特徴とする癌治療患者の予後評価方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明のＴＭＰＲＳＳ４（Ｔｒａｎｓｍｅｍｂｒａｎｅ　ｐｒｏｔｅａｓｅ，ｓｅｒｉｎｅ４）－特異的なヒト抗体に関するものである。
【背景技術】
【０００２】
ＴＭＰＲＳＳ４は、肺癌、肝臓癌、大腸癌、膵臓癌と胃癌においてその遺伝子が顕著に上向き調節されて発現され、大多数の膵臓癌細胞株で高く過発現されることが確認され、悪性甲状腺腫瘍で過発現し、このような類型の腫瘍の診断及び予後の評価マーカーとして提案された（非特許文献１、２）。
【０００３】
最近、ＴＭＰＲＳＳ４の癌での生物学的機能が明らかにされているが（非特許文献３）、それによると、ＴＭＰＲＳＳ４が浸潤、転移、移動及び癒着とヒト上皮性腫瘍細胞でのＥＭＴ（ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ　ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ　ｔｒａｎｓｉｔｉｏｎ）に重要な媒介物であり、ＴＭＰＲＳＳ４の癌に対する新しい治療用標的可能性を説明している。ＴＭＰＲＳＳ４に対する研究はあまり多くないが、強力で独立的な予後マーカーとしての可能性と、それに対する阻害剤の開発が浸潤及び転移抑制ターゲットとして可能性が大きいので、抗癌ターゲットとしてのＴＭＰＲＳＳ４に対する抗体を開発する必要性もまた増大している。
【０００４】
それで、本発明者等は、大腸癌細胞株の表面で発現するＴＭＰＲＳＳ４に特異的に結合する１３種のヒト抗体を選別して、前記ヒト抗体が既存の非ヒト由来抗体と類似水準の結合能を有することを確認して本発明を完成した。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【０００５】
【非特許文献１】Ｋｅｂｅｂｅｗ　Ｅ．等，Ａｎｎ　Ｓｕｒｇ，２００５年，第２４２（３）巻，ｐ．３５３－３６１
【非特許文献２】Ｋｅｂｅｂｅｗ　Ｅ．等，Ｃａｎｃｅｒ，２００６年，第１０６（１２）巻，ｐ．２５９２－２５９７
【非特許文献３】Ｊｕｎｇ　Ｈ．等，Ｏｎｃｏｇｅｎｅ１７，２００７年，第２７（１８）巻，ｐ．２６３５－２６４７
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００６】
本発明の目的は、ＴＭＰＲＳＳ４に特異的なヒト抗体を提供することである。
【０００７】
本発明の他の目的は、前記ヒト抗体の重鎖またはその断片をコードするポリヌクレオチド、及び前記ポリヌクレオチド及びヒト重鎖の不変領域を含む発現ベクターを提供することである。
【０００８】
本発明の他の目的は、前記ヒト抗体の軽鎖またはその断片をコードするポリヌクレオチド、及び前記ポリヌクレオチド及びヒト軽鎖の不変領域を含む発現ベクターを提供するこ

とである。
【０００９】
本発明の他の目的は、前記ヒト抗体の重鎖またはその免疫学的に活性を有した断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを宿主細胞に導入して製造された形質転換体を提供することである。
【００１０】
本発明の他の目的は、前記ヒト抗体の軽鎖またはその免疫学的に活性を有した断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを同時に宿主細胞に導入して製造された形質転換体を提供することである。
【００１１】
本発明の他の目的は、前記ヒト抗体の重鎖またはその断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び軽鎖またはその断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを同時に宿主細胞に導入して製造された形質転換体を提供することである。
【００１２】
本発明の他の目的は、前記形質転換体を培養してＴＭＰＲＳＳ４に特異的なヒト抗体を製造する方法を提供することである。
【００１３】
また、本発明は、前記ヒト抗体を含む組成物を提供することである。
【００１４】
また、本発明は、前記ヒト抗体を含む薬学的組成物を提供することである。
【００１５】
本発明の他の目的は、薬学的に有効な量の前記ヒト抗体をＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌にかかった個体に投与する工程を含む、ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌を予防及び治療する方法を提供することである。
【００１６】
また、本発明は、前記ヒト抗体、ヒト抗体の軽鎖または重鎖、またはその免疫学的に活性を有した断片及び放射性同位元素を含む組成物を提供することである。
【００１７】
本発明の他の目的は、前記癌の検出用組成物を癌細胞と接触させる工程を含む試験管内のＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌の免疫検出方法を提供することである。
【００１８】
本発明の他の目的は、前記癌の検出用組成物の診断的有効量を個体に投与する工程を含む、生体内ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌の映像化方法を提供することである。
【００１９】
本発明の他の目的は、前記検出用組成物を用いたＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌の生体内治療方法を提供することである。
【００２０】
本発明の他の目的は、前記検出用組成物を用いた癌治療の予後評価方法を提供することである。
【課題を解決するための手段】
【００２１】
前記目的を達成するため、本発明は、配列番号７～１８からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域（以下、ＨＣＤＲ）１、配列番号１９～３１からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ２、及び配列番号３２～４４からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ３を含む重鎖可変領域（V_H）を含む重鎖またはその断片、及び、配列番号５８～７０からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有する軽鎖相補性決定領域（以下、ＬＣＤＲ）１、配列番号７１～８３からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ２、及び配列番号８４～９６からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（V_L）を含む軽鎖また

はその断片を含むＴＭＰＲＳＳ４に特異的なヒト抗体を提供する。
【００２２】
また、本発明は、前記ヒト抗体の重鎖またはその免疫学的に活性を有した断片をコードするポリヌクレオチド、及び前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。
【００２３】
また、本発明は、前記ヒト抗体の軽鎖またはその免疫学的に活性を有した断片をコードするポリヌクレオチド、及び前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。
【００２４】
また、本発明は、前記ヒト抗体の重鎖またはその免疫学的に活性を有した断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを宿主細胞に導入して製造された形質転換体を提供する。
【００２５】
また、本発明は、前記ヒト抗体の軽鎖またはその免疫学的に活性を有した断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを同時に宿主細胞に導入して製造された形質転換体を提供する。
【００２６】
また、本発明は、前記ヒト抗体の重鎖またはその免疫学的に活性を有した断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び軽鎖またはその免疫学的に活性を有した断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを同時に宿主細胞に導入して製造された形質転換体を提供する。
【００２７】
また、本発明は、前記形質転換体を培養してＴＭＰＲＳＳ４に特異的なヒト抗体を製造する方法を提供する。
【００２８】
また、本発明は、前記ヒト抗体を含む組成物を提供する。
【００２９】
また、本発明は、前記ヒト抗体を含む薬学的組成物を提供する。
【００３０】
また、本発明の薬学的に有効な量の前記ヒト抗体をＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌にかかった個体に投与する工程を含む、ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌を治療する方法を提供する。
【００３１】
また、本発明は、前記ヒト抗体、ヒト抗体の軽鎖または重鎖、またはその免疫学的に活性を有した断片及び放射性同位元素を含む組成物を提供する。
【００３２】
また、本発明は、前記癌の検出用組成物を癌細胞と接触させる工程を含む試験管内のＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌の免疫検出方法を提供する。
【００３３】
また、本発明は、前記検出用組成物の診断的有効量を個体に投与する工程、及び、前記個体に対する検出映像を得る工程を含む、生体内ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌の映像化方法を提供する。
【００３４】
また、本発明は、
１）前記放射性同位元素を含む組成物を個体の静脈内に投与する工程、
２）前記工程１）の組成物を検出して腫瘍細胞を確認する工程、
３）工程２）で確認された腫瘍細胞を手術的切除によって除去する工程を含む、ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌の生体内治療方法を提供する。
【００３５】
同時に、本発明は、
１）前記放射性同位元素を含む組成物を腫瘍細胞が除去された患者の静脈内に投与する工

程、
２）前記工程１）の組成物を検出して腫瘍細胞を確認する工程、
３）工程２）で腫瘍細胞が検出されなければ、腫瘍細胞がすべて除去されたと判断することを特徴とする、癌治療患者の予後評価方法を提供する。
【発明の効果】
【００３６】
本発明の大腸癌細胞で発現するＴＭＰＲＳＳ４に特異的なヒト抗体は、前記ＴＭＰＲＳＳ４が過発現した癌の診断、疾患の分類、映像化、治療及び予後判定などに用いることができる。
【図面の簡単な説明】
【００３７】
【図１】ＴＭＰＲＳＳ４－ＦＬＡＧ発現ベクターの開列地図である。
【図２】精製された２ＸＦＬＡＧ－ＴＭＰＲＳＳ４をＳＤＳ－ＰＡＧＥで確認した結果を示した図である。
【図３】ＦＬＡＧが除去されて精製されたＴＭ－ＥＫをＳＤＳ－ＰＡＧＥで確認した結果を示した図で、ａ：ＴＭ－ＥＫ製造模式図、及び、ｂ：精製されたＴＭ－ＥＫをＳＤＳ－ＰＡＧＥで確認した結果。
【図４】ＴＭＰＲＳＳ４のタンパク質分解活性を測定した結果を示した図である。
【図５】精製された抗－ＴＭＰＳ４－ＦＬＡＧ多クローン性抗体をＳＤＳ－ＰＡＧＥで確認した結果を示した図である。
【図６】パニング１～３次でのファージ抗体探索結果を示した図で、ａ：ＴＭＰＳ４－ＥＫ、及び、ｂ：ＴＭＰＳ４－ＦＬＡＧ。
【図７】ＴＭＰＲＳＳ４に対する単一ファージクローン抗体の多様性をフィンガープリンティングを通じて確認した結果を示した図である。
【図８ａ】ＴＭＰＲＳＳ４に対する単一ファージクローン抗体の重鎖及び軽鎖ＣＤＲで用いられているポリペプチドを分析した結果を示した図で、ａ：重鎖、及び、ｂ：軽鎖。
【図８ｂ】ＴＭＰＲＳＳ４に対する単一ファージクローン抗体の重鎖及び軽鎖ＣＤＲで用いられているポリペプチドを分析した結果を示した図で、ａ：重鎖、及び、ｂ：軽鎖。
【図９】ＴＭＰＲＳＳ４多クローン性抗体と単一クローン抗体の結合特異性を比較した結果を示した図で、ａ：多クローン性抗体、及び、ｂ：単一クローン抗体。
【図１０】ＴＭＰＲＳＳ４多クローン性抗体と単一クローン抗体が大腸癌細胞株に特異的に結合することを確認した結果を示した図で、ａ：多クローン性抗体、ｂ：単一クローン抗体Ｔ２－６Ｇ、ｃ：単一クローン抗体Ｔ２－１２Ａ、及び、ｄ：単一クローン抗体Ｔ１－９Ｆ。
【図１１】ｐＮＡＴＡＢ　Ｈベクター及びｐＮＡＴＡＢ　Ｌベクターの開列地図を示した図で、ａ：ｐＮＡＴＡＢ　Ｈベクター、及び、ｂ：ｐＮＡＴＡＢ　Ｌベクター。
【図１２】全長形態のＩｇＧを発現及び精製してウエスタンブロットで確認した結果を示した図で、ａ：単一クローン抗体Ｔ２－６Ｃ、及び、ｂ：単一クローン抗体Ｔ２－６Ｇ、Ｔ２－３Ａ及びＴ２－８Ｆ。
【図１３】精製された単一クローン抗体Ｔ２－６Ｃ及びＴ２－６ＧをＳＤＳ－ＰＡＧＥで確認した結果を示した図である。
【図１４】ＴＭＰＲＳＳ４多クローン性抗体と精製された単一クローン抗体Ｔ２－６Ｃ及びＴ２－６Ｇが、大腸癌細胞株に特異的に結合することを確認した結果を示した図で、ａ：多クローン性抗体、ｂ：単一クローン抗体Ｔ２－６Ｃ、及び、ｃ：単一クローン抗体Ｔ２－６Ｇ。
【図１５】ＴＭＰＲＳＳ４多クローン性抗体が、大腸癌細胞株ｃｏｌｏ２０５の浸潤を阻害することを確認した結果を示した図である。
【図１６】単一クローン抗体Ｔ２－６Ｃが、大腸癌細胞株Ｃｏｌｏ２０５の浸潤を阻害することを確認した結果を示した図である。
【図１７】単一クローン抗体Ｔ２－６Ｇが、大腸癌細胞株Ｃｏｌｏ２０５の浸潤を阻害す

ることを確認した結果を示した図である。
【図１８】ＴＭＰＲＳＳ４過発現細胞株Ｃｏｌｏ２０５及び低発現細胞株Ｓｗ４８０の移動に、ＴＭＰＲＳＳ４多クローン性抗体が及ぼす影響を確認した結果を示した図である。
【図１９】単一クローン抗体Ｔ２－６Ｃが、ＴＭＰＲＳＳ４過発現細胞株Ｃｏｌｏ２０５の移動を阻害することを確認した結果を示した図である。
【図２０】単一クローン抗体Ｔ２－６Ｇが、ＴＭＰＲＳＳ４過発現細胞株Ｃｏｌｏ２０５の移動を阻害することを確認した結果を示した図である。
【発明を実施するための形態】
【００３８】
以下、本発明で用いた用語を説明する。
【００３９】
「可変領域」と言うのは、抗原と特異的に結合する機能を遂行しながら配列上の多くの変異を見せる抗体分子の部分を意味し、可変領域には、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３が存在する。前記ＣＤＲの間には、フレームワーク領域（ＦＲ）部分が存在してＣＤＲ環を支持する役割をする。
【００４０】
「相補性決定領域」は、抗原の認識に関与する環状の部位で、この部位の配列が変わることによって抗体の抗原に対する特異性が決定される。
【００４１】
「パニング（ｐａｎｎｉｎｇ）」は、ファージの外壁（ｃｏａｔ）にペプチドを発現するファージライブラリーから、標的分子（抗体、酵素、細胞表面レセプターなど）と結合する性質を有したペプチドを表面に発現しているファージのみを選択し出す過程をいう。
【００４２】
以下、本発明を詳しく説明する。
【００４３】
本発明の配列番号７～１８からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域（以下、ＨＣＤＲ）１、配列番号１９～３１からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ２及び配列番号３２～４４からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む重鎖またはその断片、及び、配列番号５８～７０からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有する軽鎖相補性決定領域（以下、ＬＣＤＲ）１、配列番号７１～８３からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ２及び配列番号８４～９６からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む軽鎖またはその断片を含むＴＭＰＲＳＳ４に特異的なヒト抗体を提供する。
【００４４】
好ましくは、前記重鎖可変領域は、配列番号４５～５７からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有し、前記軽鎖可変領域は配列番号９７～１０９からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有する。
【００４５】
前記抗体は、全長抗体形態であるのみならず抗体分子の機能的な断片を含む。全長抗体は、２個の全長の軽鎖及び２個の全長の重鎖を有する構造でそれぞれの軽鎖は、重鎖とジスルフィド結合で連結されている。抗体分子の機能的な断片と言うのは、抗原結合機能を保有している断片を意味し、抗体断片の例は、（ｉ）軽鎖の可変領域（V_L）及び重鎖の可変領域（V_H）と軽鎖の不変領域（C_L）及び重鎖の一番目不変領域（C_{H1}）からなるＦａｂ断片；（ｉｉ）V_H及びC_{H1}ドメインからなるＦｄ断片；（ｉｉｉ）単一抗体のV_L及びV_HドメインからなるＦｖ断片；（ｉｖ）V_HドメインからなるｄＡｂ断片（Ｗａｒｄ　ＥＳ等，Ｎａｔｕｒｅ，１９８９年，第３４１巻，ｐ．５４４－５４６）］；（ｖ）分離したＣＤＲ領域；（ｖｉ）２個の連結されたＦａｂ断片を含む２価断片のＦ（ａｂ’）２断片；（ｖｉｉ）V_Hドメイン及びV_Lドメインが抗原結合部位を形成するよ

うに結合させるペプチドリンカーによって結合された単一鎖Ｆｖ分子（ｓｃＦｖ）；（ｖｉｉｉ）二特異的な単一鎖Ｆｖ二量体（ＰＣＴ／ＵＳ９２／０９９６５）及び（ｉｘ）遺伝子融合によって製作された多価または多特異的な断片のディアボディ（ｄｉａｂｏｄｙ）ＷＯ９４／１３８０４）などを含む。

【００４６】

本発明では、ＴＭＰＲＳＳ４に対するヒト抗体をファージディスプレイ技術を用いて、ｓｃＦｖ形態で得て、単一ファージクローン（ｍｏｎｏ　ｐｈａｇｅ　ｃｌｏｎｅ）形態でスクリーニングすることで、ＴＭＰＲＳＳ４に特異的な１３種の単一クローンファージ（ｍｏｎｏｃｌｏｎｅ　ｐｈａｇｅ）を得た。

【００４７】

本発明の具体的な実施例で組換え技術で得たＴＭＰＲＳＳ４（図１及び図２参照）の活性を確認した後（図３及び図４参照）、多クローン性抗体（図５参照）及び単一クローン抗体の製造に用いた。前記ＴＭＰＲＳＳ４を多様性を有したヒト由来ｓｃＦｖライブラリー細胞（ｈｕｍａｎ　ｎａｉｖｅ　ｓｃＦｖ　ｌｉｂｒａｒｙ　ｃｅｌｌ）から製造したライブラリーファージと反応してパニング（ｐａｎｎｉｎｇ）させた後、ＴＭＰＲＳＳ４抗原に強く結合する単一クローンをスクリーニングした（表２、３及び図６参照）。前記選別された単一クローンをフィンガープリンティング（ｆｉｎｇｅｒｐｒｉｎｔｉｎｇ）で確認した後（図７参照）、それぞれの配列を分析して抗体のV_HとV_LのＣＤＲ部位を確認した（表６及び図８参照）。前記抗体と生殖系列抗体群の類似性をＮＣＢＩのＩｇＢＬＡＳＴプログラム（／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｉｇｂｌａｓｔ／）を用いて確認した結果（表７参照）、１３種のＴＭＰＲＳＳ４に特異的なファージ抗体を得た。前記選別された単一クローン抗体は、多クローン性抗体に比べて信号の強さは小さかったが、非特異的結合なしにきれいに約３０ＫＤａの抗原タンパク質を検出することができ（図９参照）、ＴＭＰＲＳＳ４が過多発現された大腸癌細胞株でＴＭＰＲＳＳ４を特異的に認識して結合することができた（図１０参照）。

【００４８】

また、本発明は、前記ヒト抗体の重鎖またはその免疫学的に活性を有した断片をコードするポリヌクレオチド、及び前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。

【００４９】

また、本発明は、前記ヒト抗体の軽鎖またはその免疫学的に活性を有した断片をコードするポリヌクレオチド、及び前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。

【００５０】

本発明の具体的な実施例から組換え技術で得たＴＭＰＲＳＳ４を用いて、ＴＭＰＲＳＳ４抗原に強く結合する単一クローンをスクリーニングした（表２、３及び図６参照）。前記選別された単一クローンをフィンガープリンティングで確認した後（図７参照）、それぞれの配列を分析して抗体のV_HとV_LのＣＤＲ部位を確認した（表６及び図８参照）。前記抗体と生殖系列抗体群の類似性を確認した結果（表７参照）、１３種のＴＭＰＲＳＳ４に特異的なファージ抗体を得た。前記選別された単一クローン抗体は、非特異的結合なしにきれいに約３０ＫＤａの抗原タンパク質を検出することができ（図９参照）、ＴＭＰＲＳＳ４が過多発現された大腸癌細胞株でＴＭＰＲＳＳ４を特異的に認識して結合することができた（図１０参照）。

【００５１】

本発明のヒト抗体の軽鎖及び重鎖またはその断片をコードするポリヌクレオチドは、コドンの縮退性によってまたは前記ヒト抗体の軽鎖及び重鎖またはその断片を発現させようとする生物で選り好みされるコドンを考慮して、コーディング領域から発現されるヒト抗体の軽鎖及び重鎖またはその断片のアミノ酸配列を変化させない範囲内でコーディング領域に多様な変形が成り立ち得、コーディング領域を除いた部分でも遺伝子の発現に影響を及ぼさない範囲内で多様な変形または修飾が成り立ち得、そのような変形遺伝子も本発明の範囲に含まれることを当業者はよく理解することができるでしょう。すなわち、本発明のポリヌクレオチドは、これと同等な活性を有するタンパク質をコーディングする限り、

一つ以上の核酸塩基が置換、欠失、挿入またはそれらの組合わせによって変異され得るし、それらも本発明の範囲に含まれる。このようなポリヌクレオチドの配列は、単鎖または二重鎖であり得、ＤＮＡ分子またはＲＮＡ（ｍＲＮＡ）分子であり得る。

【００５２】

前記発現ベクターの製作時には、前記ヒト抗体の軽鎖及び重鎖またはその断片を生産しようとする宿主細胞の種類によって、プロモーター、ターミネーター、エンハンサーなどの発現調節配列、膜標的化または分泌のための配列などを適切に選択して目的によって多様に組み合わせることができる。

【００５３】

本発明の発現ベクターは、プラスミドベクター、コズミドベクター、バクテリオファージベクター及びウイルスベクターなどを含むがこれに制限されない。相応しい発現ベクターは、プローモーター、オペレーター、開始コドン、終結コドン、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーのような発現調節エレメントの外にも、膜標的化または分泌のためのシグナル配列またはリーダー配列を含み、目的によって多様に製造することができる。発現ベクターのプローモーターは、構成的または誘導性であり得る。前記シグナル配列には、宿主がエシェリキア属菌の場合には、ＰｈｏＡシグナル配列、ＯｍｐＡシグナル配列などが、宿主がバシラス属菌の場合には、α－アミラーゼシグナル配列、スブチリシンシグナル配列などが、宿主が酵母の場合には、ＭＦαシグナル配列、ＳＵＣ２シグナル配列などが、宿主が動物細胞の場合には、インシュリンシグナル配列、α－インターフェロンシグナル配列、抗体分子シグナル配列などを用いることができるが、これに制限されない。また、発現ベクターは、ベクターを含む宿主細胞を選択するための選択マーカーを含むことができ、複製可能な発現ベクターの場合、複製原点を含む。

【００５４】

また、本発明は、前記ヒト抗体の重鎖またはその免疫学的に活性を有した断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを宿主細胞に導入して製造された形質転換体を提供する。

【００５５】

また、本発明は、前記ヒト抗体の軽鎖またはその免疫学的に活性を有した断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを同時に宿主細胞に導入して製造された形質転換体を提供する。

【００５６】

また、本発明は、前記ヒト抗体の重鎖またはその免疫学的に活性を有した断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び軽鎖またはその免疫学的に活性を有した断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを同時に宿主細胞に導入して製造された形質転換体を提供する。

【００５７】

本発明の具体的な実施例では、単一クローンファージの軽鎖及び重鎖をコードする遺伝子を収得してそれぞれベクターに連結した後、前記発現ベクターを同時に宿主細胞に導入して発現された全長ＩｇＧ形態のヒト抗体を確認した（図１２参照）。前記全長ＩｇＧ形態のヒト抗体を精製した後（図１３参照）、ＴＭＰＲＳＳ４に対する結合力をＦＡＣＳで確認した（図１４参照）。

【００５８】

本発明による前記発現ベクターを適切な宿主細胞、例えば、大腸菌または酵母細胞などに形質転換させた後、形質転換された宿主細胞を培養することで本発明によるヒト抗体の軽鎖及び重鎖またはその断片を大量生産することができる。宿主細胞の種類による適切な培養方法及び培地条件などは、当該分野の通常の技術者に知られた公知技術から当業者が容易に選択することができる。前記宿主細胞は、大腸菌またはバシラスサブチリスのような原核生物であることができる。また、サッカロマイセスセレビシエのような酵母、昆虫細胞、植物細胞、動物細胞から由来した真核細胞であることができる。さらに好ましくは、前記動物細胞は、自家または同種異系動物細胞であることができる。自家または同種異

系動物細胞に導入して製造された形質転換体は、個体に投与されて癌を治療する細胞治療などに用いることもできる。前記宿主細胞への発現ベクター導入方法は、当業者に公知されたいずれの方法を用いても構わない。

【００５９】

また、本発明は、前記形質転換体を培養してＴＭＰＲＳＳ４に特異的なヒト抗体を製造する方法を提供する。

【００６０】

具体的に、

１）前記形質転換体を培養する工程、及び

２）前記培養液から前記ヒト抗体を精製する工程を含むＴＭＰＲＳＳ４に特異的なヒト抗体の製造方法を提供する。

【００６１】

前記培養培地には、当業者に公知された培養培地の中で形質転換体に相応しい培地を選択して用いるのが好ましい。前記抗体精製方法は、当業者に公知されたいずれの精製方法も使用可能である。

【００６２】

本発明の具体的な実施例では、単一クローンファージの軽鎖及び重鎖をコードする遺伝子を収得して、それぞれベクターに連結した後、前記発現ベクターを同時に宿主細胞に導入して発現された全長ＩｇＧ形態のヒト抗体を確認した（図１２参照）。前記全長ＩｇＧ形態のヒト抗体をタンパク質Ａ－親和度クロマトグラフィーカラムを用いて精製した後（図１３参照）、ＴＭＰＲＳＳ４に対する結合力をＦＡＣＳで確認した（図１４参照）。

【００６３】

また、本発明は、前記ヒト抗体を含む組成物を提供する。

【００６４】

また、本発明は、前記ヒト抗体を含む薬学的組成物を提供する。

【００６５】

前記薬学的組成物は、ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌の予防及び治療に有用に用いることができる。前記ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌は、大腸癌、肺癌、肝臓癌、膵臓癌、胃癌及び悪性甲状腺腫瘍からなる群から選択されたいずれかひとつであることが好ましいが、これに限定されず、ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌はすべて可能である。

【００６６】

本発明の具体的な実施例で、ＴＭＰＲＳＳ４単一クローン抗体は、大腸癌細胞株でラビット及びヒト正常ＩｇＧに比べて５０％以上明らかな浸潤の阻害を示し（図１５、図１６及び図１７参照）、ＴＭＰＲＳＳ４によって惹起された大腸癌細胞株の移動を、ＴＭＰＲＳＳ４特異的な多クローン性抗体及び単一クローン抗体で阻害したことを確認した（図１８～１９参照）。同時に、本発明単一クローン抗体が、ＴＭＰＲＳＳ４が過発現された大腸癌細胞株の増殖を抑制するように誘発されたことを確認した。それで、本発明単一クローン抗体は、ＴＭＰＲＳＳ４が過発現された癌予防及び治療用組成物として有用に用いることができる。

【００６７】

本発明の薬学的組成物は、前記ＴＭＰＲＳＳ４に特異的なヒト抗体または前記形質転換体を選択的に含むことができ、前記成分に追加で同一または類似の機能を示す有効成分を１種以上含むことができる。また、本発明薬学的組成物の投与のために、前記に記載した有効成分以外に追加で薬剤学的許容可能な担体を１種以上含んで製造することができる。例えば、薬剤学的に許容可能な担体としては、食塩水、滅菌水、リンゲル液、緩衝食塩水、デキストロース溶液、マルトデキストリン溶液、グリセロール、エチルアルコール、リポソーム及びこれら成分中の一つ以上の成分を混合して用いることができ、必要によって抗酸化剤、緩衝液及び静菌剤など異なる通常の添加剤を添加することができる。また、希釈剤、分散剤、界面活性剤、結合剤及び滑剤を付加的に添加して水溶液、懸濁液及び乳濁液などのような注射用剤形に製剤化することができ、標的細胞に特異的に作用するよう

に標的細胞に特異的な抗体またはその他リガンドを前記の担体とともに結合させて用いることができる。同時に、当該技術分野の適正な方法またはレミングトンの文献（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｅａｓｔｏｎ ＰＡ）に掲載されている方法などを用いて各疾患または成分によって好ましく製剤化することができる。

【００６８】

本発明の薬学的組成物は、非経口で投与することができ、非経口投与としては、皮下注射、静脈注射、筋肉内注射または胸部内注射注入方式が挙げられる。非経口投与用剤形に製剤化するためには、本発明の薬学的組成物は、安定剤または緩衝液とともに混合して溶液または懸濁液に製造してこれをアンプルまたはバイアルの単位投与型に製剤化する。

【００６９】

本発明の薬学的組成物は、投与経路によって多様な形態で製造することができる。例えば、本発明薬学的組成物は、注射用途に相応しい滅菌水溶液または分散液の形態に製造することができ、または凍結乾燥技術を用いて凍結乾燥された形態に製造することができる。凍結乾燥された薬学的組成物は、典型的に約４℃で維持され、補助剤を含むか含まない安定化溶液、例えば、食塩水または／及びＨＥＰＥＳによって復元することができる。

【００７０】

本発明の方法を実施するにおいて、投与される薬学的組成物の量に影響を及ぼす因子としては、これに限定されるのではないが、投与方式、投与頻度、治療が進行中の特定疾病、疾病の重症度、疾病の病歴、個体が異なる治療剤とともに併用治療法が進行中かどうか、及び治療が進行中の個体の年齢、身長、体重、健康、及び身体条件を含む。一般的に治療が進行中の患者の体重が増加するほど、本発明の薬学的組成物をより多く投薬することが好ましい。

【００７１】

また、本発明の薬学的に有効な量の前記ヒト抗体を、ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌にかかった個体に投与する工程を含む、ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌を治療する方法を提供する。

【００７２】

前記ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌は、大腸癌、肺癌、肝臓癌、膵臓癌、胃癌及び悪性甲状腺腫瘍からなる群から選択されたいずれかひとつであることが好ましいが、これに限定されないでＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌はすべて可能である。

【００７３】

本発明の具体的な実施例で、ＴＭＰＲＳＳ４単一クローン抗体は、大腸癌細胞株で浸潤、移動及び増殖を阻害することを確認した（図１５～１９参照）。それで、本発明の単一クローン抗体は、ＴＭＰＲＳＳ４が過発現された癌予防及び治療に有用に用いることができる。

【００７４】

本発明が適用可能な個体は脊椎動物で、好ましくは哺乳動物であり、さらに好ましいのはネズミ、ウサギ、モルモット、ハムスター、犬、猫のような実験動物で、最も好ましいのはチンパンジー、ゴリラのような類人猿類動物である。

【００７５】

本発明のヒト抗体の投与方法は、使用目的によって非経口投与（例えば、静脈内、皮下、腹腔内または局所などに投与する方法）が可能で、静脈投与が好ましい。場合によって固形癌に対する投与では、抗体の接近を早く容易にするために局所的な投与が好ましいこともある。投与量は、患者の体重、年齢、性別、健康状態、食餌、投与時間、投与方法、排泄率及び疾患の重症度等によってその範囲が多様である。１回の投与量は、約５～５００ｍｇ／ｍ^{2}の量で、一日単位または週単位で投与することができる。前記有効量は、前記患者を治療する医師の裁量によって調節することができる。

【００７６】

本発明のヒト抗体は、癌患者の治療のために単独または手術、ホルモン治療、薬物治療

及び生物学的反応調節剤と並行して用いることができる。

【００７７】

また、本発明の前記ヒト抗体、ヒト抗体の軽鎖または重鎖、またはその免疫学的に活性を有した断片及び放射性同位元素を含む組成物を提供する。

【００７８】

本発明の具体的な実施例で、単一クローンＴＭＰＲＳＳ４抗体は、ＴＭＰＲＳＳ４が過多発現された大腸癌細胞株でＴＭＰＲＳＳ４を特異的に認識して結合したことを確認した（図１０参照）。それで、本発明単一クローン抗体は、ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌の検出用組成物として有用に用いることができる。

【００７９】

前記組成物は、ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌の放射線免疫治療用及び検出用として有用に用いることができる。前記ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌は、大腸癌、肺癌、肝臓癌、膵臓癌、胃癌及び悪性甲状腺腫瘍からなる群から選択されたいずれか一つであることが好ましいが、これに限定されないでＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌はすべて可能である。

【００８０】

好ましい治療用放射性同位元素の例としては、^{3}Ｈ、^{11}Ｃ、^{14}Ｃ、^{18}Ｆ、^{64}Ｃｕ、^{76}Ｂｒ、^{86}Ｙ、^{99m}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{123}Ｉ、^{177}Ｌｕ及びこれらの混合物及び組み合わせを含む。前記治療用放射性同位元素は、ヒト抗体と結合するかヒト抗体が結合された運搬体に含まれることを特徴とする。

【００８１】

また、本発明は、前記放射性同位元素を含む組成物を癌細胞と接触する工程を含む試験管内のＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌の免疫検出方法を提供する。

【００８２】

前記ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌は、大腸癌、肺癌、肝臓癌、膵臓癌、胃癌及び悪性甲状腺腫瘍からなる群から選択されたいずれか一つであることが好ましいが、これに限定されないでＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌はすべて可能である。

【００８３】

本発明の具体的な実施例で、単一クローンＴＭＰＲＳＳ４抗体は、ＴＭＰＲＳＳ４が過多発現された大腸癌細胞株でＴＭＰＲＳＳ４を特異的に認識して結合したことを確認した（図１０参照）。それで、本発明の単一クローン抗体は、ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌の検出用組成物として有用に用いることができる。

【００８４】

前記放射性同位元素を含む組成物は、洗浄や複合体の分離などその後の工程を容易にするために固形基質に結合することができる。固形基質は、例えば合成樹脂、ニトロセルロース、ガラス基板、金属基板、グラスファイバー、微細球体及び微細ビードなどがある。また、前記合成樹脂には、ポリエステル、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ポリプロピレン、ＰＶＤＦ及びナイロンなどがある。

【００８５】

また、癌細胞は、前記検出用組成物と接触前に適当な程度に希釈することができる。

【００８６】

また、本発明は、１）前記放射性同位元素を含む組成物の診断的有効量を個体に投与する工程、及び、

２）前記個体に対する検出映像を収得する工程を含む生体内ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌の映像化方法を提供する。

【００８７】

前記ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌は、大腸癌、肺癌、肝臓癌、膵臓癌、胃癌及び悪性甲状腺腫瘍からなる群から選択されたいずれか一つであることが好ましいが、これに限定されないでＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌はすべて可能である。

【００８８】

本発明の具体的な実施例で、単一クローンＴＭＰＲＳＳ４抗体は、ＴＭＰＲＳＳ４が過多発現された大腸癌細胞株でＴＭＰＲＳＳ４を特異的に認識して結合したことを確認した（図１０参照）。それで、本発明の単一クローン抗体は、ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌の検出用組成物として有用に用いることができる。

【００８９】

前記検出映像は、近赤外光イメージング、ＰＥＴ、ＭＲＩまたは超音波イメージングによって得られることを特徴とする。

【００９０】

また、本発明は、

１）前記放射性同位元素を含む組成物を個体の静脈内に投与する工程、

２）前記工程１）の組成物を検出して腫瘍細胞を確認する工程、

３）工程２）で確認された腫瘍細胞を手術的切除によって除去する工程を含む、ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌の生体内治療方法を提供する。

【００９１】

前記ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌は、大腸癌、肺癌、肝臓癌、膵臓癌、胃癌及び悪性甲状腺腫瘍からなる群から選択されたいずれか一つであることが好ましいが、これに限定されないでＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌はすべて可能である。

【００９２】

本発明の具体的な実施例で、ＴＭＰＲＳＳ４単一クローン抗体は、大腸癌細胞株で浸潤、移動及び増殖を阻害することを確認した（図１５～１９参照）。それで、本発明の単一クローン抗体は、ＴＭＰＲＳＳ４が過発現される癌予防及び治療に有用に用いることができる。

【００９３】

同時に、本発明は、

１）前記放射性同位元素を含む組成物を大腸癌腫瘍細胞が除去された患者の静脈内に投与する工程、

２）前記工程１）の組成物を検出して腫瘍細胞を確認する工程、

３）工程２）で腫瘍細胞が検出されなければ、腫瘍細胞がすべて除去されたと判断することを特徴とする癌治療患者の予後評価方法を提供する。

（発明を実施するための形態）

以下、本発明の実施例によってさらに詳しく説明する。

【００９４】

但し、下記の実施例は、本発明を例示するだけのものであって、本発明の内容が下記の実施例によって限定されるのではない。

【実施例１】

【００９５】

ＴＭＰＲＳＳ４抗原タンパク質の製造

＜１－１＞ＴＭＰＲＳＳ４遺伝子クローニング

韓国生命工学研究院人間遺伝体機能研究産業団のＫＵＧＩ（Ｋｏｒｅａｎ　ＵｎｉＧｅｎｅ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ）からヒトＴＭＰＲＳＳ４遺伝子を含んでいるプラスミド（ＩＲＡＵ－６１－Ｅ０６；クローンＩＤ：ｈＭＵ０１１２８６）の分譲を受けた。前記プラスミドを鋳型ＤＮＡにして、前記ＴＭＰＲＳＳ４のプロテアーゼドメイン（ａａ２０５～４３４）のみを発現させるために、正方向プライマー（配列番号１：５’－ＧＡＧＧＡＧＣＡＴＡＴＧＧＡＴＴＡＴＡＡＡＧＡＴＣＡＴＧＡＴＡＴＴＧＡＴＴＡＴＡＡＡＧＡＴＧＡＴＧＡＴＧＡＴＡＡＡＧＴＧＧＴＧＧＧＴＧＧＧＧＡＧＧＡＧ－３’）及び逆方向プライマー（配列番号２：５’－ＧＡＧＧＡＧＣＴＣＧＡＧＣＡＧＣＴＣＡＧＣＣＴＴＣＣＡＧＡＣ－３’）を用いて遺伝子を下記の条件で増幅した後、ＮｄｅＩとＸｈｏＩで処理した後、ライゲースを用いてｐＥＴ２１ｃ（Ｎｏｖａｇｅｎ，米国）にサーブクローニングした。ＰＣＲ条件は、全体反応液が５０μｌの時、鋳型は１００ｎｇになるように加えて、９４℃で２分、９４℃で３０秒、５５℃で３０秒、７２℃で１分３０秒で３０サイ

クル、７２℃で１０分間反応させてＰＣＲ産物を得た。同時に、前記サーブクローニングされたベクターの塩基配列を確認した（図１）。

【００９６】

＜１－２＞ＴＭＰＲＳＳ４タンパク質の発現及び精製

前記サーブクローニングされたベクターをＢＬ２１（ＤＥ３）で形質転換させた後、ＬＢ（＋ａｍｐ）培地に接種して一晩中培養した後、５００ｍｌ ＬＢ（＋ａｍｐ）培地に１／１００に希釈して接種した。３７℃で２時間程度ＯＤ＝０．５まで追加で培養した後、ＩＰＴＧを１ｍＭの濃度で処理した後、４時間の間培養した。大腸菌を５０００ｒｐｍで１０分間遠心分離して得た後、バグバスター（Ｂｕｇ ｂｕｓｔｅｒ）溶液１０ｍｌに懸濁した後、１５分間砕いた後、１２０００ｒｐｍで３０分間遠心分離して水溶性分画と不溶性分画を分離した。これをＳＤＳ－ＰＡＧＥで分析した結果、ＴＭＰＲＳＳ４タンパク質は不溶性分画に存在した。不溶性分画を８Ｍウレア溶液（８Ｍ ｕｒｅａ，０．１Ｍ NaH_2PO_4，０．０１Ｍ ＴｒｉｓＣｌ ｐＨ７．９）で溶解した後、Ｎｉ－ＮＴＡレジン（Ｑｉａｇｅｎ，米国）１ｍｌに結合させた後、１０ｍｌの洗浄緩衝溶液（８Ｍ ｕｒｅａ，０．１Ｍ NaH_2PO_4，０．０１Ｍ ＴｒｉｓＣｌ ｐＨ５．９）で洗浄して、５ｍｌの溶離緩衝溶液（８Ｍ ｕｒｅａ，０．１Ｍ NaH_2PO_4，０．０１Ｍ ＴｒｉｓＣｌ ｐＨ４．５）で溶離した。溶離したＴＭＰＲＳＳ４タンパク質（ＴＭＰＳ４－ＦＬＡＧ）は、ＰＢＳ（＋１０％ ｇｌｙｃｅｒｏｌ）溶液に透析して１０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルで電気泳動した後、クマシー染色して約３５ｋＤａの大きさを確認した（図２）。

【００９７】

前記精製されたＴＭＰＳ４－ＦＬＡＧタンパク質１ｍｇを図３のａに示したように、４０ｎｇエンテロキナーゼ（Ｅｎｔｅｒｏｋｉｎａｓｅ；ＮＥＢ，米国）で６時間の間室温で反応させた後、Ｎｉ－ＮＴＡレジンを用いてＴＭＰＲＳＳ４のみを精製した（ＴＭ－ＥＫ）。前記精製されたタンパク質を１０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルで電気泳動した後、クマシー染色して約３１ｋＤａの大きさを確認した（図３ｂ）。

【実施例２】

【００９８】

ＴＭＰＲＳＳ４タンパク質による酵素活性測定

ＴＭＰＲＳＳ４の細胞外ドメインのトリプシン類似タンパク質分解活性を測定するために、ＴＭＰＳ４－ＦＬＡＧタンパク質（２．２５μｇ）に蛍光ペプチドトリプシン基質であるＢｏｃ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｒｇ－ＡＭＣ（ｔ－ｂｕｔｙｌｏｘｙｃａｒｂｏｎｙｌ（ｔ－Ｂｏｃ）－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ａｒｇ－７ａｍｉｄｏ－４－メチルクマリン；Ｂ４１５３，Ｓｉｇｍａ，米国）とカリクレイン基質であるＺ－Ｐｈｅ－Ａｒｇ－ＡＭＣ（Ｚ－Ｐｈｅ－Ａｒｇ７－アミド－４－メチルクマリンハイドロクロライド；Ｃ９５２１，Ｓｉｇｍａ，米国）をそれぞれ基質緩衝溶液（５０ｍＭ ｔｒｉｓ，１０ｍＭ $CaCl_2$，１μＭ $ZnCl_2$）に１００μＭの濃度で溶解して、ＴＭＰＳ４－ＦＬＡＧタンパク質と混ぜた後、エンテロキナーゼ（０．０９ｎｇ）を添加して時間別にＶｉｃｔｏｒ３プレートリーダー（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ，米国）を用いて３８０／４６０ｎｍでペプチド基質の加水分解による蛍光信号を測定した。

【００９９】

その結果、図４に示したようにエンテロキナーゼによるＴＭＰＲＳＳ４の活性型（ＴＭ－ＥＫ）のトリプシン類似活性による基質の加水分解が、対照群と対比して時間別に活性を示すことを確認することができた。したがって、標的抗原としてＴＭＰＲＳＳ４が成功的に合成されたことを確認した。

【実施例３】

【０１００】

ファージライブラリーの製造

多様性を有したヒト由来ｓｃＦｖライブラリー細胞２．７×10^{10}を２×ＹＴ ＣＭ［Ｔｒｙｐｔｏｎｅ（ＣＯＮＤＡ，１６１２．００）１７ｇ、酵母エキス（ＣＯＮＤＡ，

１７０２．００）１０ｇ、ＮａＣｌ（ｓｉｇｍａ，Ｓ７６５３－５kg）５ｇ、クロラムフェニコール（ｓｉｇｍａ，Ｃ０８５７）３４μｇ／ｍｌ）］、２％グルコース（ｓｉｇｍａ，Ｇ５４００）及び５mＭ ＭｇＣｌ$_2$（ｓｉｇｍａ，Ｍ２３９３）を含む培地（３Ｌ）で、３７℃で２～３時間の間培養した後（ＯＤ$_{600}$＝０．５～０．７）、ヘルパーファージを感染させて２×ＹＴＣＭＫ［２×ＹＴ ＣＭ，カナマイシン（ｓｉｇｍａ，Ｋ１８７６）７０μｇ／ｍｌ，１mＭ ＩＰＴＧ（ＥＬＰＩＳＢＩＯ，ＩＰＴＧ０２５）］培地に３０℃で１６時間の間培養した。培養した細胞を遠心分離（４５００ｒｐｍ，１５分，４℃）した後、上澄み液に４％ＰＥＧ（Ｆｌｕｋａ，８１２５３）６０００と３％ＮａＣｌ（ｓｉｇｍａ，Ｓ７６５３）を添加してよく溶解した後、氷で１時間の間反応させた。再び遠心分離（８０００ｒｐｍ，２０分，４℃）した後、ペレットにＰＢＳを添加して溶解した後、遠心分離（１２０００ｒｐｍ，１０分，４℃）してファージライブラリーを含む上澄み液を新しいチューブに入れて４℃で保管した。

【実施例４】

【０１０１】

多クローン性抗体の製造

ＴＭＰＳ４－ＦＬＡＧを抗原としてエイビーフロンティア（韓国）に依頼し、２匹のウサギに３回反復注射して多クローン性抗体血清を得た。これを再び抗原特異的親和度を用いて精製を行なって、ＴＭＰＳ４－ＦＬＡＧに特異的に結合する多クローン性抗体を２ｍｇ／ｍｌの濃度で１ｍｌを収得した。前記収得した多クローン性抗体を非還元性条件で、１０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥで確認した。

【０１０２】

その結果、図５に示したように精製された抗体を確認した。以後、これを陽性対照群に用いた。

【実施例５】

【０１０３】

単一クローン抗体の製造

＜５－１＞パニング（Ｐａｎｎｉｎｇ）過程

実施例２で収得した精製されたＴＭＰＲＳＳ４抗原（ＴＭＰＳ４－ＦＬＡＧとＴＭ－ＥＫ）各３０μｇをイムノソルブ（Ｉｍｍｕｎｏｓｏｒｂ）チューブ（Ｎｕｎｃ４７０３１９）に４ｍｌのコーティング緩衝溶液［Ｎａ$_2$ＣＯ$_3$（ｓｉｇｍａ，Ｓ７７９５）１．５９ｇ、ＮａＨＣＯ$_3$（ｓｉｇｍａ，Ｓ８８７５）２．９３ｇ、ＮａＮ$_3$（ｓｉｇｍａ，Ｓ２００２），０．２ｇ］で４℃で１６時間程度回転機でコーティングした後、室温で２時間の間ＰＢＳに溶解してスキムミルク［（ＢＤ，２３２１００）－４％ｉｎ １ＸＰＢＳ］を用いて免疫チューブでブロッキングした。免疫チューブに実施例３で製造したファージライブラリー２ｍｌを添加して室温で２時間の間反応させ、ＰＢＳＴ（０．０５％）で５回、ＰＢＳで２回洗浄した。洗浄後、特異的に結合したｓｃＦｖ－ファージのみ１００ｍＭ ＴＥＡ（Ｓｉｇｍａ Ｔ－０８８６）に溶離して、溶出したファージを大腸菌（ＸＬ１－Ｂｌｕｅ，ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，２００２４９）に感染させて増幅した。一回目パニングで増幅されたファージを、ＰＢＳＴ洗浄回数のみ増やして（２次：１３回、３次：２３回）同一な方法で２次及び３次パニングを行なった。

【０１０４】

その結果、表１に示したように３次で抗原に対するファージのコロニー力価が１００倍以上増幅されることを確認した。

【０１０５】

【表１】

標的抗原	パニング回数	初期ファージ数	結合したファージ数
ＴＭＰＲＳＳ４－ＦＬＡＧ	１st	４×１０^{13}	４．６×１０^{6}
	２nd	７．７×１０^{12}	５×１０^{7}
	３rd	７．２×１０^{12}	１．９×１０^{9}
ＴＭ－ＥＫ	１st	２．３×１０^{13}	５×１０^{6}
	２nd	１．２×１０^{13}	４．８×１０^{6}
	３rd	１．２４×１０^{13}	２．９６×１０^{8}

【０１０６】

＜５－２＞ファージＥＬＩＳＡによるファージ抗体探索

＜５－２－１＞パニング結果確認

１次から３次までパニングして氷らせておいた細胞ストックを５ｍｌの２×ＹＴＣＭ、２％グルコース，５ｍＭ ＭｇＣｌ$_2$培地にＯＤ$_{600}$＝０．１になるように入れた後、３７℃で２～３時間（ＯＤ$_{600}$＝０．５～０．７）培養した。以後、Ｍ１ヘルパーファージを感染させて２×ＹＴＣＭＫ、５ｍＭ ＭｇＣｌ$_2$、１ｍＭ ＩＰＴＧ培地に３０℃で１６時間の間培養した。培養細胞を遠心分離した後（４５００ｒｐｍ、１５分、４℃）上澄み液（１次～３次パニング ポリｓｃＦｖ－ファージ）を新しいチューブに移した。９６ウェル免疫プレート（ＮＵＮＣ ４３９４５４）に二種類の抗原をウェル当り１００ｎｇずつ４℃で１６時間程度コーティング緩衝溶液で処理してコーティングした後、ＰＢＳに溶解したスキムミルク（４％）を用いて各ウェルをブロッキングした。各ウェルにＰＢＳ－ツイーン２０（０．０５％）０．２ｍｌで洗浄後、１次～３次パニング ポリｓｃＦＶ－ファージを各ウェルに１００μｌずつ入れて常温で２時間の間反応させた。また、各ウェルにＰＢＳ－ツイーン２０（０．０５％）０．２ｍｌを用いて４回洗浄した後、二次抗体である抗－Ｍ１３－ＨＲＰ（Ａｍｅｒｓｈａｍ２７－９４２１－０１）を１：２０００に希釈して室温で１時間の間反応した。ＰＢＳ－ツイーン２０（０．０５％）０．２ｍｌで洗浄した後、ＯＰＤタブレット（Ｓｉｇｍａｐ８７８７－ＴＡＢ）をＰＣ緩衝溶液［$C_6H_8O_7$．H_2O（ｓｉｇｍａ，Ｃ０７０６）５．１ｇ、Na_2HPO_4（ｓｉｇｍａ，Ｓ７９０７）７．３ｇ］に溶解した基質溶液を作って、ウェル当り１００μｌずつ入れて１０分間発色させた後、４９０ｎｍで吸光度を分光光度計（ＭｏｌｅｃｕｌａｒＤｅｖｉｃｅ，米国）で測定した。

【０１０７】

その結果、図６に示したように３次で抗原に対する特異的な結合能が増強されることを確認した。

【０１０８】

＜５－２－２＞単一クローン抗体の選別

前記結合能が大きい多クローンファージ抗体群（３次パニング）から得たコロニーを、２×ＹＴＣＭ、２％グルコース、５ｍＭ ＭｇＣｌ$_2$培地１ｍｌを含んだ９６ディープウェルプレート（バイオニア９００３０）で、３７℃で１６時間の間培養した。培養した細胞のＯＤ$_{600}$値が０．１になるように１００～２００μｌを取って１ｍｌの２×ＹＴＣＭ、２％グルコース、５ｍＭ ＭｇＣｌ$_2$培地に希釈した後、９６ディープウェルプレートで３７℃でＯＤ$_{600}$値が０．５～０．７になるように２～３時間培養した。Ｍ１ヘルパーファージをＭＯＩ値が１：２０になるように感染させた後、２×ＹＴＣＭＫ、５ｍＭ ＭｇＣｌ$_2$、１ｍＭ ＩＰＴＧ培地に３０℃で１６時間培養した。培養した細胞を遠心分離（４５００ｒｐｍ、１５分、４℃）した後、上澄み液を取って４％ＰＥＧ６０００と３％ＮａＣｌを添加してよく溶解した後、氷で１時間の間反応させた。再び遠心分離（８０００ｒｐｍ、２０分、４℃）した後、ペレットにＰＢＳを添加して溶解した後、遠心分離（１２０００ｒｐｍ、１０分、４℃）して上澄み液を取って新しいチューブに移して、３次パニングして得た単一クローンｓｃＦｖ－ファージを４℃で保管した。

【０１０９】

以後、９６ウェル免疫プレートに二つの抗原をウェル当り１００ｎｇずつ入れて、４℃で１６時間の間コーティングした後、ＰＢＳに溶解したスキムミルク（４％）を用いて各ウェルをブロッキングした。各ウェルにＰＢＳ－ツイーン２０（０．０５％）０．２ｍｌを用いて洗浄した後、３次パニングして得た単一クローンｓｃＦｖ－ファージ（ｅａｃｈ１００　ｓｃＦｖ－ｐｈａｇｅ）を各ウェルに１００μｌずつ入れて常温で２時間の間反応させた。再び、各ウェルにＰＢＳ－ツイーン２０（０．０５％）０．２ｍｌを用いて４回洗浄した後、２次抗体である抗－Ｍ１３－ＨＲＰを１／２０００に希釈して室温で１時間の間反応した。ＰＢＳ－ツイーン２０（０．０５％）０．２ｍｌで洗浄した後、発色して吸光度４９０ｎｍで測定した。

【０１１０】

その結果、各抗原に対する結合能が強い単一ファージクローンは、ＴＭＰＳ４－ＦＬＡＧに対して１５個（表２）とＴＭＰＳ４－ＥＫに対して３５個（表３）など、総５０個の単一ファージクローンを選別した。

【０１１１】

【表２】

a-Myc				2xFlag peptide				TMPRSS4			
0.1331	0.1004	0.161	0.3503	0.0007	0.0114	-0.0004	-0.0002	1.1864	0.0666	1.1335	0.6845
0.1811	0.1661	2.4121	0.1238	-0.002	0.0039	0.0022	-0.0001	1.1915	1.3613	2.8497	1.2023
0.5538	0.2104	0.1695	1.9212	0.0023	-0.0028	0.0062	-0.001	2.2938	1.499	1.3426	2.8607
0.1287	0.1887	0.1286	0.098	-0.0018	-0.0017	-0.0014	0.0006	0.0073	1.3574	1.1518	1.1222
2.6361	0.1557	0.214	0.1308	-0.0018	-0.0024	-0.0028	-0.0016	2.8245	1.2143	1.7721	1.495
0.1153	0.1461	2.3709	0.7187	-0.0018	-0.0019	-0.0015	-0.0009	0.9604	1.2248	2.9253	2.4846
0.2105	0.1823	0.098	0.3629	-0.0028	-0.0039	-0.0024	-0.0002	-0.0008	1.4834	1.0884	2.2009
0.0007	0.294	2.1367	0.1701	-0.0012	-0.0014	0.0055	0	0.0012	0.2502	2.9155	1.2892
0.1987	0.2519	0.1019	-0.0022	-0.0023	-0.0022	-0.002	-0.0019	-0.0024	1.2927	0.0156	-0.0007
0.5709	-0.0025	0.1009	0.0701	-0.0037	-0.0048	-0.0038	-0.0039	0.0034	-0.0026	0.0037	-0.0022
-0.0035	0.2491	0.202	0.026	-0.0033	-0.0042	-0.0037	-0.004	0.0036	1.5313	-0.0025	-0.0019
-0.0025	-0.0029	0.0286	0.0596	-0.0036	-0.0032	-0.0028	-0.0023	-0.0035	-0.0037	-0.0018	-0.0034
-0.0051	0.2243	0.0266	-0.0003	-0.0024	0.0035	-0.0038	-0.0046	-0.0043	1.2621	0.0365	-0.0033
0.2588	0.0142	-0.0042	0.019	-0.0036	-0.0025	0.002	-0.004	1.3278	0.1661	-0.0036	-0.0034
0.4319	-0.0041	-0.0034	-0.0042	-0.0043	-0.0021	-0.0034	-0.0031	1.7376	-0.0031	-0.0039	-0.0037
0.4176	-0.0023	0.0848	-0.0029	-0.0023	0.006	-0.0002	0	1.8127	-0.0023	0.0037	-0.0026

【０１１２】

【表３】

α-myc						TM-EK					
0.3591	0.783	2.2268	1.4212	1.9753	2.1453	0.0079	0.0542	2.3081	0.0442	2.7452	2.6617
0.5592	0.3708	0.004	-0.0098	2.7023	1.0532	0.0061	0.0049	-0.0077	-0.0074	2.7663	1.3702
-0.0098	-0.0009	0.1083	0.1651	0.8825	1.4964	-0.0086	-0.0081	0.0451	0.0411	0.5213	2.7806
0.2322	0.5214	0.1214	0.6184	0.6602	-0.0042	0.0017	0.0324	-0.0078	-0.0027	0.0107	0.0009
-0.0083	-0.0105	-0.0104	-0.007	1.087	1.0222	-0.0091	-0.0066	-0.0072	-0.0075	0.0321	0.0595
-0.0116	-0.0008	0.003	0.0337	0.9934	1.2158	-0.007	-0.0093	-0.0066	-0.0055	2.4717	2.617
-0.0098	-0.0104	0.0871	-0.0102	1.0224	2.5485	-0.0079	-0.0104	0.0396	-0.0093	0.4413	2.2067
1.3365	0.6618	-0.0077	-0.0096	1.3266	-0.0087	0.0031	0.0477	-0.0081	-0.0046	2.4913	0
2.5569	2.2748	2.6546	2.4443	-0.0113	0.6904	2.7672	2.7294	2.7506	2.7078	0	2.423
2.5541	1.187	1.6959	2.2482	0.9865	-0.0104	2.3385	0.6491	1.7594	2.6667	0.2899	-0.0084
1.2619	2.283	1.0976	1.039	0.6417	1.7241	2.4788	2.6489	2.4717	2.4135	0.8713	2.2305
1.286	0.3775	2.4574	0.9369	1.0916	0.5452	1.5297	0.003	2.4674	0.2737	2.5672	0.0206
1.358	0.6647	1.1115	2.1723	1.1206	1.3818	2.5558	0.2181	2.5539	2.2052	0.1395	2.7175
1.2434	2.3015	2.4622	2.0075	1.1916	1.8476	2.6169	2.4958	2.8229	1.3234	0.0937	2.471
1.1921	0.6616	2.26	0.0501	1.1977	1.039	0.7781	0.0054	2.7182	0.0167	2.4298	1.1626
1.3202	1.3396	0.2422	-0.0068	1.2494	2.2726	0.724	1.6058	0.0319	0.0065	2.5365	2.6947

【０１１３】

＜５－３＞単一クローンファージ分類及び検査

＜５－３－１＞フィンガープリンティングによる検証

１次選別された単一クローン５０個の単一クローン細胞１μｌとＴａｑ．ＤＮＡポリメラーゼ（ゼンダックス５Ｕ／μｌ）０．２μｌ、５０ｐ／μｌの正方向プライマー（ｐｅｌＢ５、配列番号５：５’－ＣＴＡＧＡＴＡＡＣＧＡＧＧＧＣＡＡＡＴＣＡＴＧ－３’）及び逆方向プライマー（ｃｌａ３、配列番号６：５’－ＣＧＴＣＡＣＣＡＡＴＧＡＡＡＣＣＡＴＣ－３’）０．２μｌ、１０Ｘ緩衝溶液３μｌ、１０ｍＭ ｄＮＴＰ ｍｉｘ０．６μｌ、蒸留水２４．８μｌを混合してコロニーＰＣＲ（ｉＣｙｃｌｅｒ ｉＱ，ＢＩＯ－ＲＡＤ）を行なった。ＰＣＲプログラムの条件は、下記の表４のとおりである。

【０１１４】

【表４】

温度	時間	サイクル
９５℃	５分	
９５℃	３０秒	３０サイクル
５６℃	３０秒	
７２℃	１分	
７２℃	１０分	
４℃		

【０１１５】

前記コロニーＰＣＲ産物は、１％アガロースゲル（Ｓｅａｋｅｍ ＬＥ，ＣＡＭＥＲＥＳ ５０００４）で確認し、ＢｓｔＮＩ（Ｒｏｃｈｅ１１２８８０７５００１，１０Ｕ／μｌ）０．２μｌを取って、３７℃で２～３時間反応させた。反応条件は、下記の表５のとおりである。前記切断した産物を８％ＤＮＡポリアクリルアミドゲルで確認した。

【０１１６】

【表５】

１０Ｘ緩衝溶液	３μｌ
コロニーＰＣＲ産物	１０μｌ
ＢｓｔＮＩ（１０Ｕ／μｌ）	０．２μｌ
蒸留水	１６．８μｌ

【０１１７】

その結果、図７に示したように ＢｓｔＮＩによって切断された単一クローンファージ抗体の断片に対して多様性が確認された。

【０１１８】

＜５－３－２＞塩基配列分析による検証

前記５０種の単一ファージクローンを２×ＹＴＣＭ、２％グルコース、５ｍＭ ＭｇＣｌ$_2$培地（５ｍｌ）に３７℃で１６時間の間培養した。培養した単一クローンからＤＮＡ精製キット（Ｎｕｃｌｏｇｅｎ５１１２）を用いてＤＮＡを収得した後、配列番号５のｐｅｌＢ５プライマーを用いた配列分析を依頼した（ソルゼント、韓国）。

【０１１９】

その結果、表６及び図８に示したように選別された抗体のV_HとV_LのＣＤＲ領域を確認した。

【０１２０】

これら抗体と生殖細胞系列（ｇｅｒｍ ｌｉｎｅ）抗体群の類似性をＮＣＢＩのＩｇＢＬＡＳＴプログラム（／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｉｇｂｌａｓｔ／）を用いて調査した結果、１３種のＴＭＰＲＳＳ４に特異的なファージ抗体を得て、それを下記の表７に整理して提示した。

【０１２１】

【表６－１】

		重鎖			軽鎖		
グループ	クローン名	ＣＤＲ１	ＣＤＲ２	ＣＤＲ３	ＣＤＲ１	ＣＤＲ２	ＣＤＲ３
２	Ｔ１－１１Ｇ	ＲＹＴＭＨ：配列番号７	ＶＩＳＳＤＧＳＫＫＹＹＧＤＳＶＫＧ：配列番号１９	ＧＧＧＫＧＨＷＬＤＴ：配列番号３２	ＲＡＳＱＳＩＳＫＷＬＡ：配列番号５８	ＡＡＳＮＬＱＳ：配列番号７１	ＬＱＳＮＳＬＰＩＴ：配列番号８４
３	Ｔ１－１２Ｃ	ＮＹＧＭＨ：配列番号８	ＶＩＳＹＤＧＳＴＫＹＹＡＤＳＶＲＧ：配列番号２０	ＧＳＤＶＡＹ：配列番号３３	ＲＳＳＱＳＬＶＹＳＤＧＮＴＹＬＮ：配列番号５９	ＫＶＳＮＲＤＳ：配列番号７２	ＭＱＳＬＲＴＰＬＴ：配列番号８５
３	Ｔ２－９Ｇ	ＮＹＧＭＨ：配列番号８	ＶＩＳＹＤＧＳＴＫＹＹＡＤＳＶＲＧ：配列番号２０	ＧＳＤＶＡＹ：配列番号３３	ＲＳＳＱＳＬＶＹＳＤＧＮＴＹＬＮ：配列番号５９	ＫＶＳＮＲＤＳ：配列番号７２	ＭＱＳＬＲＴＰＬＴ：配列番号８５
４	Ｔ１－９Ｆ	ＳＹＡＭＳ：配列番号９	ＡＩＴＧＳＧＧＳＴＦＹＡＤＳＶＫＧ：配列番号２１	ＧＧＮＬＤＶ：配列番号３４	ＲＳＳＱＳＬＶＨＳＮＧＮＴＹＬＴ：配列番号６０	ＫＩＳＫＲＦＳ：配列番号７７	ＭＱＬＴＱＦＰＬＴ：配列番号８６
４	Ｔ２－１２Ｆ	ＳＹＡＭＳ：配列番号９	ＡＩＴＧＳＧＧＳＴＦＹＡＤＳＶＫＧ：配列番号２１	ＧＧＮＬＤＶ：配列番号３４	ＲＳＳＱＳＬＶＨＳＮＧＮＴＹＬＴ：配列番号６０	ＫＩＳＫＲＦＳ：配列番号７７	ＭＱＬＴＱＦＰＬＴ：配列番号８６
９	Ｔ２－８Ｆ	ＮＹＡＭＮ：配列番号１０	ＡＩＳＧＳＧＧＳＴＹＹＡＤＳＶＫＧ：配列番号２２	ＬＲＧＡＦＤＩ：配列番号３５	ＲＳＳＱＳＬＬＨＳＮＧＹＮＹＬＤ：配列番号６４	ＬＧＳＫＲＡＡ：配列番号７４	ＭＱＡＬＱＴＰＴ：配列番号８７
１２	Ｔ２－１２Ｃ	ＲＹＧＩＨ：配列番号１１	ＶＩＳＹＤＧＮＩＫＹＹＡＤＳＶＫＧ：配列番号２３	ＬＷＲＱＳＡＡＤＡＦＤＩ：配列番号３６	ＴＧＴＳＳＤＶＧＧＳＳＹＶＳ：配列番号６２	ＤＶＴＲＲＰＳ：配列番号７５	ＡＳＹＡＧＳＨＹＬ：配列番号８８
５	Ｔ２－３Ａ	ＳＹＡＭＨ：配列番号１２	ＳＩＳＷＳＳＮＮＩＲＹＡＤＳＶＫＧ：配列番号２４	ＲＡＡＡＫＡＦＤＩ：配列番号３７	ＴＧＴＳＴＤＩＧＧＹＮＹＶＳ：配列番号６３	ＤＶＮＮＲＰＳ：配列番号７６	ＳＳＹＴＳＳＳＦＶ：配列番号８９
８	Ｔ２－７Ｂ	ＤＳＶＡＷＮ：配列番号１３	ＲＴＹＹＫＳＫＷＹＮＤＹＡＶＳＶＲＳ：配列番号２５	ＧＧＧＫＧＭＤＶ：配列番号３８	ＴＧＴＳＧＤＩＧＧＦＮＹＶＳ：配列番号６４	ＤＶＳＲＲＰＳ：配列番号７７	ＡＳＹＡＧＴＫＦＷＬ：配列番号９０
７	Ｔ２－６Ｇ	ＮＹＧＭＨ：配列番号８	ＶＩＳＹＤＧＳＫＫＹＹＡＤＳＶＫＧ：配列番号２６	ＧＴＴＭＤＶ：配列番号３９	ＳＧＳＮＳＮＩＧＳＮＴＶＮ：配列番号６５	ＧＨＮＱＲＰＳ：配列番号７８	ＡＳＷＤＤＴＶＳＧＰＫＷＶ：配列番号９１

【０１２２】

【表６－２】

１０	Ｔ２－１０Ｅ	ＤＹＡＭＨ：配列番号１４	ＧＩＳＷＮＳＧＳＩＧＹＡＤＳＶＫＧ：配列番号２７	ＧＬＲＧＬＲＹＲＮＹＹＹＧＭＤＶ：配列番号４０	ＱＡＳＱＤＩＴＮＹＬＮ：配列番号６６	ＡＡＳＳＬＨＴ：配列番号７９	ＱＱＳＨＳＰＰＦＴ：配列番号９２
１１	Ｔ２－６Ｃ	ＤＹＡＩＨ：配列番号１５	ＧＩＳＷＮＳＥＩＶＧＹＧＤＳＶＫＧ：配列番号２８	ＧＳＳＧＲＡＦＤＩ：配列番号４１	ＲＡＳＱＳＩＳＴＹＬＮ：配列番号６７	ＧＡＴＳＬＱＳ：配列番号８０	ＱＱＳＹＮＬＰＲＴ：配列番号９３
１	Ｔ１－５Ｇ	ＤＨＹＭＳ：配列番号１６	ＹＩＳＮＲＧＹＳＩＹＹＡＤＳＶＫＤ：配列番号２９	ＤＬＲＳＳＤＡＨＴＷＧＧＶＤＡＦＤＩ：配列番号４２	ＲＡＳＱＳＩＳＳＷＬＡ：配列番号６８	ＫＡＳＳＬＥＳ：配列番号８１	ＱＱＦＮＮＮＬＦＳ：配列番号９４
６	Ｔ２－６Ａ	ＳＹＤＶＨ：配列番号１７	ＷＶＮＰＮＳＧＮＡＤＹＡＱＫＦＱＧ：配列番号３０	ＧＲＦＧＡＦＤＶ：配列番号４３	ＲＡＳＱＧＩＳＲＷＬＡ：配列番号６９	ＡＡＳＮＬＱＳ：配列番号８２	ＱＱＡＮＳＦＰＬＴ：配列番号９５
１３	Ｔ２－１２Ａ	ＮＹＡＭＳ：配列番号１８	ＡＩＳＧＳＧＡＳＴＮＹＡＤＳＶＫＧ：配列番号３１	ＬＧＲＥＱＹＬＡＲＧＹＦＥＨ：配列番号４４	ＱＧＤＳＬＲＳＹＹＡＳ：配列番号７０	ＧＫＮＮＲＰＳ：配列番号８３	ＳＳＲＤＳＳＧＮＨＬＶ：配列番号９６

【０１２３】

【表７】

A. 抗原TMPS4-Flagに対し４種類の抗体を得る

クローン名	VH	Identities	VL	Identities	VH CDR3- a.a seq)	VL(CDR3-a.a seq)	グループ
T1-5G	VH3-11	273/296 (92.23%)	L12a	269/277 (97.11%)	DLRSSDAHTWGGVDAFDI	QQFNNNNLFS	1
T1-11G	VH3-30	278/295 (94.24%)	L5	269/284 (94.72%)	GGGKGHWLDT	LQSNSLPIT	2
T1-12C	VH3-30	282/295 (95.59%)	A17	267/285 (93.68%)	GSDVAY	MQSLRTPLT	3
T1-9F	VH3-23	284/294 (96.60%	A23	293/301 (97.34%)	GGNLDV	MQLTQFPLT	4

B. 抗原TMPS4-Flagから得た４種類の抗体と抗原TMPS4-EKに対し９種類の抗体を得る

クローン名	VH	Identities	VL	Identities	VH CDR3- a.a seq)	VL(CDR3-a.a seq)	グループ
T2-9G	VH3-30	283/295 (95.93%)	A17	267/285 (93.68%)	GSDVAY	MQSLRTPLT	3
T2-12F	VH3-23	285/294 (96.94%)	A23	293/301 (97.34%)	GGNLDV	MQLTQFPLT	4
T2-3A	VH3-9	262/286 (91.61%	V1-4	280/290 (96.55%)	RAAAKAFDI	SSYTSSSFV	5
T2-6A	VH1-8	282/291 (96.91%)	L5	266/282 (94.33%)	GRFGAFDV	QQANSFPLT	6
T2-6G	VH3-30	283/295 (95.93%)	V1-16	255/283 (90.11%)	GTTMDV	ASWDDTVSGPKWV	7
T2-7B	VH6-1	289/304 (95.07%)	V1-3	265/286 (92.66%)	GGGKGMDV	ASYAGTKFWL	8
T2-8F	VH3-12	280/291 (96.22%)	A19	282/295 (95.59%)	LRGAFDI	MQALQTPT	9
T2-10E	VH3-9	278/291 (95.53%)	O12	267/284 (94.01%)	GLRGLRYRNYYYGMDV	QQSHSFPFFT	10
T2-6C	VH3-9	271/291 (93.13%)	O12	263/286 (91.96%)	GSSGRAFDI	QQSYNLPRT	11
T2-12C	VH3-30	280/294 (95.24%)	V1-3	272/287 (94.77%)	LWRQSAADAFDI	ASYAGSHYL	12
T2-12A	VH3-23	270/291 (92.78%)	V2-13	267/285 (93.68%)	LGREQYLARGYFEH	SSRDSSGNHLV	13

【実施例６】

【０１２４】

ＴＭＰＲＳＳ４に対するヒト抗体の特性分析

【０１２５】

＜６－１＞ファージウエスタンブロット分析

前記抗原ＴＭＰＲＳＳ４－ＦＬＡＧが各ウェルに０．１～２００ｎｇずつローディングされた１０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル２枚を１００Ｖで２時間程度電気泳動した後、ＮＣ膜（ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｃａｔ．Ｎｏ．ＨＡＴＦ０００１０）に８５Ｖで２時間の間伝達した。以後、膜を４％スキムミルクｉｎ　ＴＢＳＴで４℃で一日晩中ブロッキングした。以後、実施例４で製造した多クローンα－ＴＭＰＲＳＳ４抗体（１ｍｇ／ｍｌ）を４％スキムミルクｉｎ　ＴＢＳＴに１：２０００に希釈し、実施例５で選別された単一クローンファージ抗体の上澄み液を４％スキムミルクｉｎ　ＴＢＳＴに１：５０に希釈して常温で１時間３０分間反応させた。ＴＢＳＴで１０分に一回ずつ５回洗浄した後、それぞれ抗－マウスＩｇＧ－ＨＲＰ（Ｓｉｇｍａ）と抗－Ｍ１３－ＨＲＰ（Ａｍｅｒｓｈａｍ　ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）を用いて、４％スキムミルクｉｎ　ＴＢＳＴに１：３０００に希釈して常温で３０分間反応させた後、同じ方法で洗浄した。洗浄後、現象（Ｉｎｔｒｏｎ，Ｃａｔ．Ｎｏ．１２１４５）して多クローン性抗体と単一ファージ抗体を検出することができる抗原タンパク質の量を比較した。

【０１２６】

その結果、図９に示したようにＴＥ－６Ｃファージ抗体の場合、多クローン性抗体に比べて信号の強さは小さかったが、非特異的結合なしにきれいに約３０ＫＤａの抗原タンパク質を検出することができた。

【０１２７】

＜６－２＞ファージＦＡＣＳ分析

１００ｍｍプレートでＴＭＰＲＳＳ４を過多発現することが知られた大腸癌細胞株（ｃｏｌｏ２０５；ＡＴＣＣ）細胞株をＰＢＳで２回洗浄した後、無酵素ＰＢＳ基盤－解離緩

衝溶液（Ｇｉｂｃｏ）を添加して、３７℃で１０分間培養した。以後、細胞をスクレイパーで集めた後、１３００ｒｐｍで３分間遠心分離してペレットを２％ＰＢＦ（２％ＦＢＳ含有１ＸＰＢＳ）溶液で二度洗浄した後、２％ＰＢＦ溶液を入れて再懸濁して≧５×１０^{5}細胞の濃度で準備した。本発明の単一クローンファージ抗体１００μｌをＰＥＧで１０倍濃縮した後、１／２に希釈して前記細胞に混合した。氷で１時間の間反応させた後、１３００ｒｐｍで４℃で３分間遠心分離して上澄み液を除去した。２００μｌの２％ＰＢＦ溶液で３回洗浄した後、２％ＰＢＦ溶液に１：２００に希釈させた抗－ｇ８ｐ抗体（Ａｂｃａｍ）１００μｌを入れてよく混合して、氷で３０分間反応させた。１３００ｒｐｍで４℃で３分間遠心分離した後、上澄み液を除去して２００μｌの２％ＰＢＦ溶液で３回洗浄した。２％ＰＢＦ溶液に１：１０００で希釈させたＦＩＴＣ－連結された抗－マウスＩｇＧ　１００μｌをそれぞれの試料に混合した後、氷で３０分間反応させた。追加で洗浄した後、５００μｌの２％ＰＢＦ溶液を添加してＦＡＣＳ用チューブ（Ｆａｌｃｏｎ）に試料を移してボルテキシングした後、染色された細胞を流細胞分析機（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）で分析した。毎実験時に単一ファージ抗体を同一な条件で試料に処理して内部対照群（ｉｎｔｅｒｎａｌ　ｃｏｎｔｒｏｌ）に用いた。データは、ＷＩＮＭＤＩ２．９ソフトウエア（／／ｆａｃｓ．ｓｃｒｉｐｐｓ．ｅｄｕ／ｓｏｆｔｗａｒｅ．ｈｔｍｌ，Ｔｈｅ　Ｓｃｒｉｐｐｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）を用いて分析した。

【０１２８】

その結果、図１０に示したようにＴＭＰＲＳＳ４が過多発現された大腸癌細胞株でＴＭＰＲＳＳ４を特異的に認識して結合する単一クローンファージ抗体Ｔ２－６Ｇ、Ｔ２－１２Ａ　ＡＬＣ　Ｔ１－９Ｆなどを選別した。その外にも、Ｔ２－６Ｃ、Ｔ２－３Ａ、Ｔ２－８Ｆなども選別したが、結果は本明細書に別途記載しなかっただけである。

【０１２９】

＜６－３＞全長ＩｇＧ変換分析

ＴＭＰＲＳＳ４に対する単一クローンファージ抗体をファージからＩｇＧ全長ベクターに転換するために、重鎖は単一クローンＤＮＡ　１μｌと１０ｐｍｏｌｅ／μｌ表８の重鎖正方向プライマーと重鎖逆方向プライマー、１０Ｘ緩衝溶液５μｌ、１０ｍＭ　ｄＮＴＰ　ｍｉｘ　１μｌ、ｐｆｕ　ＤＮＡ重合酵素（ソルゼント、２．５Ｕ／μｌ）０．５μｌ、蒸留水を混合して、コロニーＰＣＲ（ｉＣｙｃｌｅｒ　ｉＱ、ＢＩＯ－ＲＡＤ）を行なった。また、軽鎖は表８の軽鎖正方向及び逆方向プライマーを用いて同一な方法でコロニーＰＣＲを行なった。

【０１３０】

【表８】

クローン名	重鎖				軽鎖			
	正方向プライマー（Ｓｆｉ　Ｉ）		逆方向プライマー（ＮｈｅＩ）		正方向プライマー（Ｓｆｉ　Ｉ）		逆方向プライマー（Ｂｇｌ　ＩＩ）	
Ｔ２－３Ａ	ＮＡＴＶＨ１－２：配列番号１１０	ＴＴＧＧＴＧＧＣＣＡＣＡＧＣＧＧＣＣＧＡＴＧＴＣＣＡＣＴＣＧＣＡＧＡＴＧＣＡＧＣＴＧＧＴＧＣＡＧＴＣ	ＮＡＴＪＨ－ＡＬ：配列番号１１４	ＧＡＧＧＡＧＧＣＡＧＣＴＧＡＧＧＡＡＧＣＧＧＴＧＡ	ＮＡＴＶＬ４：配列番号１１５	ＴＴＧＧＴＧＧＣＣＡＣＡＧＣＧＧＣＣＧＡＴＧＴＣＣＡＣＴＣＧＣＡＧＴＣＴＧＣＣＣＴＧＡＣＴＣＡＧＣＣ	ＮＡＴＪＬ１－Ｒ：配列番号１１９	ＧＡＧＧＡＧＡＧＡＴＣＴＴＡＧＧＡＣＧＧＴＧＡＣＣＴＴＧＧＴＣＣＣ
Ｔ２－６Ｃ	ＮＡＴＶＨ１－２：配列番号１１１	ＴＴＧＧＴＧＧＣＣＡＣＡＧＣＧＧＣＣＧＡＴＧＴＣＣＡＣＴＣＧＣＡＧＡＴＧＣＡＧＣＴＧＧＴＧＣＡＧＴＣ			ＮＡＴＶＫ１－１：配列番号１１６	ＴＴＧＧＴＧＧＣＣＡＣＡＧＣＧＧＣＣＧＡＴＧＴＣＣＡＣＴＣＧＧＡＣＡＴＣＣＡＧＡＴＧＡＣＣＣＡＧＴＣ	ＮＡＴＪＫ－Ｒ５：配列番号１２０	ＧＡＧＧＡＧＡＧＡＴＣＴＴＴＧＡＴＴＴＣＣＡＧＣＴＴＧＧＴ
Ｔ２－６Ｇ	ＮＡＴＶＨ３－２：配列番号１１２	ＴＴＧＧＴＧＧＣＣＡＣＡＧＣＧＧＣＣＧＡＴＧＴＣＣＡＣＴＣＧＣＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＧＴＧＧＡＧＴＣ			ＮＡＴＶＬ４：配列番号１１７	ＴＴＧＧＴＧＧＣＣ’ＡＣＡＧＣＧＧＣＣＧＡＴＧＴＣＣＡＣＴＣＧＣＡＧＴＣＴＧＣＣＣＴＧＡＣＴＣＡＧＣＣ	ＮＡＴＪＬ２－Ｒ：配列番号１２１	ＧＡＧＧＡＧＡＧＡＴＣＴＴＡＧＧＡＣＧＧＴＣＡＧＣＴＴＧＧＴＣＣＣ
Ｔ２－８Ｆ	ＮＡＴＶＨ３－２：配列番号１１３	ＴＴＧＧＴＧＧＣＣＡＣＡＧＣＧＧＣＣＧＡＴＧＴＣＣＡＣＴＣＧＣＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＧＴＧＧＡＧＴＣ			ＮＡＴＶＫ３：配列番号１１８	ＴＴＧＧＴＧＧＣＣＡＣＡＧＣＧＧＣＣＧＡＴＧＴＣＣＡＣＴＣＧＧＡＴＡＴＴＧＴＧＡＴＧＡＣＣＣＡＧＡＣＴＣＣ	ＮＡＴＪＫ－Ｒ４：配列番号４	ＧＡＧＧＡＧＡＧＡＴＣＴＴＴＧＡＴＴＴＣＣＡＣＣＴＴＧＧＴ

【０１３１】

ＰＣＲの結果収得した重鎖遺伝子をＤＮＡ－ゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した後、ｐＮＡＴＡＢ　Ｈベクター（図１１ａ）１μｌ（１０ｎｇ）、重鎖（１００～２００ｎｇ）１５μｌ、１０×緩衝溶液２μｌ、リガーゼ（１Ｕ／μｌ）１μｌ、蒸留水を混合して室温で１～２時間放置して前記ベクターと連結した。前記ベクターを形質転換用細胞（ＸＬ１－ｂｌｕｅ）とともに氷に３０分間放置後、４２℃で９０秒間熱衝撃を与えて形質導入した。再び、氷に５分間放置後、ＬＢ培地１ｍｌを注入して１時間の間３７℃で培養した。ＬＢ　Ａｍｐ（アンピシリン）固体培地に塗抹した後、３７℃で１６時間の間培養した。単一コロニーをＬＢ　Ａｍｐ液体培地５ｍｌに接種して、３７℃で１６時間の間培養した。前記培養液からＤＮＡ－ｐｒｅｐ．キット（Ｎｕｃｌｏｇｅｎ）を用いてＤＮＡを抽出した。

【０１３２】

また、軽鎖は、ｐＮＡＴＡＢ　Ｌベクター（図１１ｂ）を用いて前記のような方法でＤＮＡを抽出した。

【０１３３】

前記収得したＤＮＡのＣＭＶ－ｐｒｏＦプライマー（配列番号３：ＡＡＡ　ＴＧＧ　ＧＣＧ　ＧＴＡ　ＧＧＣ　ＧＴＧ）を用いた塩基配列分析を依頼した（ソルゼント）。

【０１３４】

その結果、全長ＩｇＧに転換したＴＭＰＲＳＳ４に対する４個のクローンファージの重鎖と軽鎖の配列がファージ抗体の配列と一致することを確認した。

【０１３５】

＜６－４＞全長ＩｇＧの検証

２９３Ｅ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にＰＥＩ（Ｃａｔ＃２３９６６，Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ）４０μｇと全長形態抗体重鎖ＤＮＡ１０μｇ、軽鎖ＤＮＡ１０μｇを入れて共同形質感染をして得た上澄み液をウエスタンブロットで確認した。対照群には、正常ヒトＩｇＧ（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂ）を用いた。

【０１３６】

その結果、図１２に示したように対照群と比べて４個のクローンファージが全長ＩｇＧ形態に転換されたことを確認した。

【０１３７】

前記４個のクローンファージ中のＴ２－６ＣとＴ２－６Ｇ全長形態ＩｇＧをタンパク質Ａ－親和度クロマトグラフィーカラム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，ＧＥ，米国）を用いて精製した後（図１３）、実施例６－２の方法でＴＭＰＲＳＳ４に対する結合力をＦＡＣＳで確認した（図１４）。

【実施例７】

【０１３８】

ＴＭＰＲＳＳ４ヒト抗体が大腸癌細胞株の浸潤及び移動に及ぼす影響研究

【０１３９】

＜７－１＞Ｃｏｌｏ２０５細胞浸潤分析

トリプシン（ｔｒｙｐｓｉｎ）（Ｇｉｂｃｏ２５３００）でＣｏｌｏ２０５細胞を採取した後、ＲＰＭＩ浸潤培養液（ｉｎｖａｓｉｏｎ　ｍｅｄｉａ）（ＲＰＭＩ，１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ，０．５％ＢＳＡ）で二度洗浄した後、浸潤培養液に細胞を2×10^{6}／ｍｌの濃度に懸濁して準備した。精製されたＴＭＰＲＳＳ４多クローン性抗体及び単一クローンＴ２－６Ｃ抗体を浸潤培養液にそれぞれ３０及び７５ｎｇ／５０ｍｌに希釈して細胞懸濁液５０μｌとＴＭＰＲＳＳ４抗体溶液５０μｌを混合した後、３７℃で二時間前培養した。２４ウェルトランスウェルプレート（ｗｅｌｌ　ｔｒａｎｓｗｅｌｌ　ｐｌａｔｅ）（８μｍ　ｐｏｒｅ　ｓｉｚｅ，ｃｏｓｔａｒ３４２２）は、マトリゲル（ＢＤ３５４２３４）を１ｍｇ／ｍｌで無血清培地（ＲＰＭＩ，１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ）に希釈してインサート（ｉｎｓｅｒｔ）の上側面に室温で一時間の間コーティングした。一時間経過後、インサートに残っているマトリゲルを除去して無血清培地で一度洗浄した。その後、５％ＦＢＳが添加されたＲＰＭＩ浸潤培養液６００μｌをチャンバー（ｃｈａｍｂｅｒ）に入れた。消毒された鉗子（ｆｏｒｃｅｐｓ）を用いてインサートを培養液が入っているチャンバーに入れた後、あらかじめ反応させておいた細胞と抗体の混合物をインサート中に１００μｌ入れて、３７℃／５％CO_2で２４時間の間培養した。マトリゲルを通過した浸潤された細胞を測定するために、インサートの上側面をＰＢＳに湿らせた綿棒で拭いて３．７％パラホルムアルデヒド５００μｌ（Ｓｉｇｍａ　ＨＴ５０）が入っているチャンバーにインサートを入れて、室温で３０分間固定した。その後、１％クリスタルバイオレット（Ｓｉｇｍａ　Ｃ３８８６）／１００ｍＭ　ＮａＢｏｒａｔｅ（Ｓｉｇｍａ　Ｓ９６４０）５００μｌに３０分間染色して水で洗浄した後、乾燥させて顕微鏡で１００倍の倍率で細胞をカウンティングした。

【０１４０】

その結果、図１５、図１６及び図１７に示したように大腸癌細胞株であるＣｏｌｏ２０

５で精製された多クローン及びＴＭＰＲＳＳ４単一クローン抗体（Ｔ２－６ＣとＴ２－６Ｇ）は、対照群に用いたラビット（図１５）及びヒト正常ＩＧｇ（図１６及び図１７）と比較して５０％以上の明らかな浸潤阻害を示した。

【０１４１】

＜７－２＞Ｃｏｌｏ２０５細胞移動分析

ＴＭＰＲＳＳ４を過発現することが知られたＣｏｌｏ２０５細胞株及びＴＭＰＲＳＳ４を低発現することが知られたＳｗ４８０（ＡＴＣＣ，ＣＣＬ－２２８）細胞株をトリプシンで採取した後、ＲＰＭＩ移動培養液（ＲＰＭＩ，１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ，０．５％ＢＳＡ）で二度洗浄した後、８×１０^{5}／ｍｌの濃度に懸濁して準備した。細胞懸濁液５０μｌと三種類の濃度（０、１及び２μＭ）に希釈しておいた多クローンＴＭＰＳ４抗体溶液、及び単一クローンＴ２－６Ｃ及びＴ２－６Ｇ抗体５０μｌ（ＴＭＰＲＳＳ４抗体を移動培養液に希釈して１０００ｎｇ／５０μｌに製造）をそれぞれ混ぜて３７℃で二時間の間前培養した。２４ウェルトランスウェルプレートは挿入下側面に０．０５％ゼラチン（Ｓｉｇｍａ　Ｇ１３９３）を用いて室温で一時間の間コーティングした。一時間経過後、インサートに残っているゼラチンを除去してＰＢＳで一度洗浄した。前記過程が終わった後、５％ＦＢＳが添加されたＲＰＭＩ移動培養液６００μｌをチャンバーに入れた。消毒された鉗子を用いてインサートをチャンバーに入れた後、あらかじめ反応させておいた細胞と抗体の混合物をインサート中に１００μｌを入れて、３７℃／５％$ＣＯ_{2}$で２４時間の間培養した。細胞の移動を測定するために先にインサートの上側面をＰＢＳに湿らせた綿棒で拭いて、３．７％パラホルムアルデヒド５００μｌが入っているチャンバーにインサートを入れて室温で３０分間固定した。その後、１％クリスタルバイオレット／１００ｍＭ　ＮａＢｏｒａｔｅ　５００μｌに３０分間染色して水で洗浄した後、乾燥させて顕微鏡で１００倍の倍率で細胞をカウンティングした。

【０１４２】

その結果、図１８に見られるように二つの大腸癌細胞株の移動に明らかな差を示し、標的抗原であるＴＭＰＲＳＳ４によって惹起された移動をＴＭＰＲＳＳ４特異的な多クローン性抗体で阻害したことを確認した。ＴＭＰＲＳＳ４に対する多クローン性抗体のみならず精製された単一クローンＴ２－６Ｃ（図１９）及びＴ２－６Ｇ（図２０）抗体も、ＴＭＰＲＳＳ４が過発現された大腸癌細胞株であるｃｏｌｏ２０５において、対照群に用いたヒト正常ＩｇＧに比べて二つともそれぞれ約５０％以上の明らかな移動の阻害を示した。

【０１４３】

＜７－３＞Ｃｏｌｏ２０５増殖分析

トリプシンでＣｏｌｏ２０５細胞を採取した後、２％ＦＢＳが添加されたＲＰＭＩ培養液で二度洗浄した後、無血清培養液（ＲＰＭＩ，１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ）に細胞を２×１０^{5}／ｍｌで懸濁して準備した。精製されたＴＭＰＲＳＳ４抗体を無血清培養液に２５０、５００及び１０００ｎｇ／４０μｌに希釈して細胞懸濁液５０μｌとＴＭＰＲＳＳ４　Ｔ２－６Ｃ抗体溶液４０μｌを混ぜて３７℃で二時間の間前培養した。反応を終えた細胞と抗体の混合物９０μｌに１０μｌのＦＢＳを添加して、９６ウェルプレートに１００μｌずつ入れて３７℃／５％$ＣＯ_{2}$で２４、４８及び７２時間培養した。それぞれのタイムポイントに合わせてＰｒｅＭｉｘ　ＷＳＴ－１細胞増殖溶液（ｔａｋａｒａ，ＭＫ４００）を１０μｌ添加して二時間の間３７℃で反応させた後、ＶＥＲＳＡ　ｍａｘマイクロプレートリーダー機で、４４０ｎｍでサンプルの吸光度を測定した。

【０１４４】

その結果、精製されたＴＭＰＲＳＳ４　Ｔ２－６Ｃ抗体が、Ｃｏｌｏ２０５細胞増殖に対し顕著な阻害を誘発したことを確認した（データは記載しなかった）。

【実施例８】

【０１４５】

結合能測定

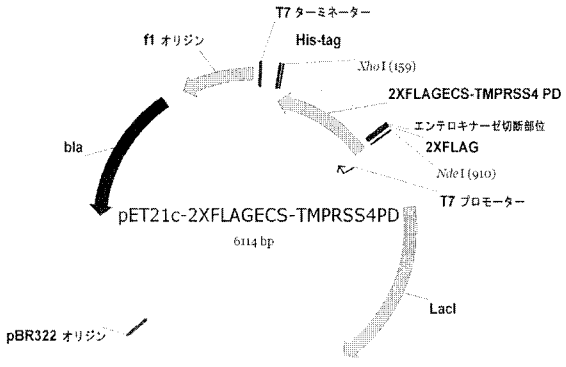
ＴＭＰＲＳＳ４に対する抗体の抗原に対する結合力をＥＬＩＳＡで測定し、ＧｒａｐｈＰａｄ　ＰＲＩＳＭ４．０プログラムで分析した結果、結合定数$Ｋ_{D}$値が約１．０３×１

0^{-9}Mと確認された。
【配列表フリーテキスト】
【０１４６】
配列番号１：TMPRSS4フォワードプライマー
配列番号２：TMPRSS4リバースプライマー
配列番号３：CMV-proFプライマー
配列番号４：NATJK-R4
配列番号５：pelB5
配列番号６：cla3
配列番号７：T1-11G VH CDR 1
配列番号８：T1-12C VH CDR 1
配列番号９：T1-9F VH CDR 1
配列番号１０：T2-8F VH CDR 1
配列番号１１：T2-12C VH CDR 1
配列番号１２：T2-3A VH CDR 1
配列番号１３：T2-7B VH CDR 1
配列番号１４：T2-10E VH CDR 1
配列番号１５：T2-6C VH CDR 1
配列番号１６：T1-5G VH CDR 1
配列番号１７：T2-6A VH CDR 1
配列番号１８：T2-12A VH CDR 1
配列番号１９：T1-11G VH CDR 2
配列番号２０：T1-12C VH CDR 2
配列番号２１：T1-9F VH CDR 2
配列番号２２：T2-8F VH CDR 2
配列番号２３：T2-12C VH CDR 2
配列番号２４：T2-3A VH CDR 2
配列番号２５：T2-7B VH CDR 2
配列番号２６：T2-6G VH CDR 2
配列番号２７：T2-10E VH CDR 2
配列番号２８：T2-6C VH CDR 2
配列番号２９：T1-5G VH CDR 2
配列番号３０：T2-6A VH CDR 2
配列番号３１：T2-12A VH CDR 2
配列番号３２：T1-11G VH CDR 3
配列番号３３：T1-12C VH CDR 3
配列番号３４：T1-9F VH CDR 3
配列番号３５：T2-8F VH CDR 3
配列番号３６：T2-12C VH CDR 3
配列番号３７：T2-3A VH CDR 3
配列番号３８：T2-7B VH CDR 3
配列番号３９：T2-6G VH CDR 3
配列番号４０：T2-10E VH CDR 3
配列番号４１：T2-6C VH CDR 3
配列番号４２：T1-5G VH CDR 3
配列番号４３：T2-6A VH CDR 3
配列番号４４：T2-12A VH CDR 3
配列番号４５：T1-11G重鎖
配列番号４６：T2- 6A重鎖
配列番号４７：T1-12C重鎖

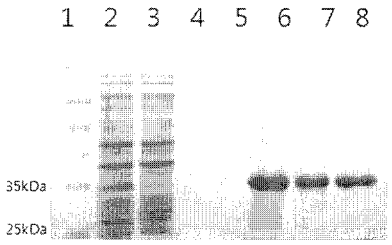
配列番号４８：T1- 9F重鎖
配列番号４９：T2-12F重鎖
配列番号５０：T2- 8F重鎖
配列番号５１：T2-12A重鎖
配列番号５２：T2-12C重鎖
配列番号５３：T2- 3A重鎖
配列番号５４：T2- 7B重鎖
配列番号５５：T2- 6G重鎖
配列番号５６：T2-10E重鎖
配列番号５７：T2- 6C重鎖
配列番号５８：T1-11G VL CDR 1
配列番号５９：T1-12C VL CDR 1
配列番号６０：T1-9F VL CDR 1
配列番号６１：T2-8F VL CDR 1
配列番号６２：T2-12C VL CDR 1
配列番号６３：T2-3A VL CDR 1
配列番号６４：T2-7B VL CDR 1
配列番号６５：T2-6G VL CDR 1
配列番号６６：T2-10E VL CDR 1
配列番号６７：T2-6C VL CDR 1
配列番号６８：T1-5G VL CDR 1
配列番号６９：T2-6A VL CDR 1
配列番号７０：T2-12A VL CDR 1
配列番号７１：T1-11G VL CDR 2
配列番号７２：T1-12C VL CDR 2
配列番号７３：T1-9F VL CDR 2
配列番号７４：T2-8F VL CDR 2
配列番号７５：T2-12C VL CDR 2
配列番号７６：T2-3A VL CDR 2
配列番号７７：T2-7B VL CDR 2
配列番号７８：T2-6G VL CDR 2
配列番号７９：T2-10E VL CDR 2
配列番号８０：T2-6C VL CDR 2
配列番号８１：T1-5G VL CDR 2
配列番号８２：T2-6A VL CDR 2
配列番号８３：T2-12A VL CDR 2
配列番号８４：T1-11G VL CDR 3
配列番号８５：T1-12C VL CDR 3
配列番号８６：T1-9F VL CDR 3
配列番号８７：T2-8F VL CDR 3
配列番号８８：T2-12C VL CDR 3
配列番号８９：T2-3A VL CDR 3
配列番号９０：T2-7B VL CDR 3
配列番号９１：T2-6G VL CDR 3
配列番号９２：T2-10E VL CDR 3
配列番号９３：T2-6C VL CDR 3
配列番号９４：T1-5G VL CDR 3
配列番号９５：T2-6A VL CDR 3
配列番号９６：T2-12A VL CDR 3
配列番号９７：T1-11G軽鎖

配列番号９８：T2- 6A軽鎖
配列番号９９：T1-12C軽鎖
配列番号１００：T1- 9F軽鎖
配列番号１０１：T2-12F軽鎖
配列番号１０２：T2- 8F軽鎖
配列番号１０３：T2-12A軽鎖
配列番号１０４：T2-12C軽鎖
配列番号１０５：T2- 3A軽鎖
配列番号１０６：T2- 7B軽鎖
配列番号１０７：T2- 6G軽鎖
配列番号１０８：T2-10E軽鎖
配列番号１０９：T2- 6C軽鎖
配列番号１１０：NATVH1-2
配列番号１１１：NATVH1-2
配列番号１１２：NATVH3-2
配列番号１１３：NATVH3-2
配列番号１１４：NATJH-ALL
配列番号１１５：NATVL4
配列番号１１６：NATVK1-1
配列番号１１７：NATVL4
配列番号１１８：NATVK3
配列番号１１９：NATJL1-R
配列番号１２０：NATJK-R5
配列番号１２１：NATJL2-R

【図１】

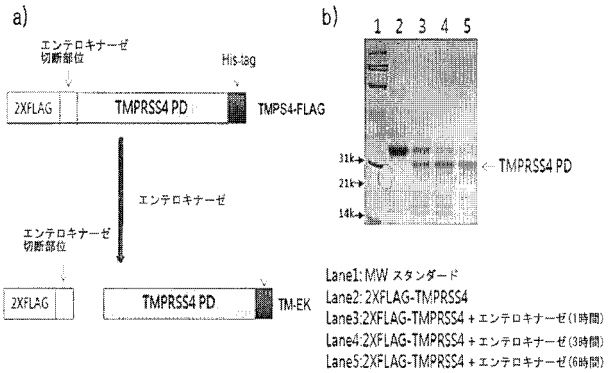


【図２】

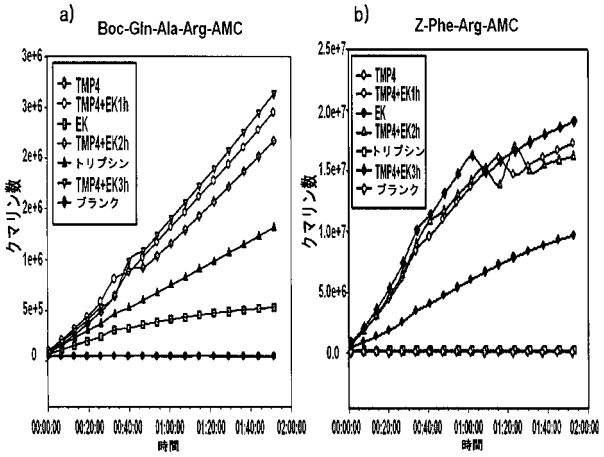


Lane1: MW Marker
Lane2: whole cell lysate
Lane3: soluble fraction from whole cell lysate
Lane4: supernatant of inclusion body wash with PBS
Lane5: supernatant of inclusion body wash with 2M urea
Lane6: inclusion body
Lane7: His-tag purified 2XFLAG-TMPRSS4
Lane8: after dialysis

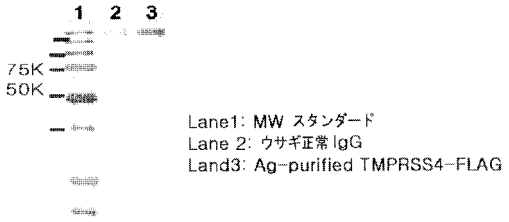
【図３】


a)
エンテロキナーゼ
切断部位
His-tag
2XFLAG
TMPRSS4 PD
TMPS4-FLAG
エンテロキナーゼ
エンテロキナーゼ
切断部位
2XFLAG
TMPRSS4 PD
TM-EK
b)
1 2 3 4 5
31k
21k
14k
TMPRSS4 PD
Lane1: MW スタンダード
Lane2: 2XFLAG-TMPRSS4
Lane3:2XFLAG-TMPRSS4 + エンテロキナーゼ(1時間)
Lane4:2XFLAG-TMPRSS4 + エンテロキナーゼ(3時間)
Lane5:2XFLAG-TMPRSS4 + エンテロキナーゼ(6時間)

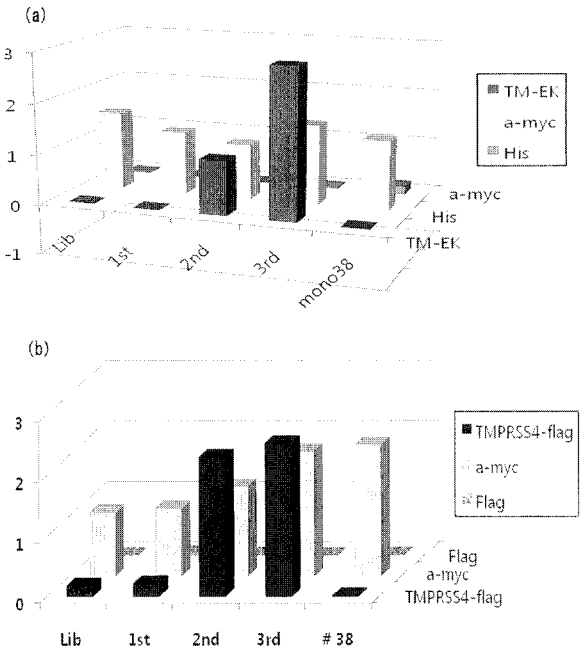
【図４】


a)
Boc-Gln-Ala-Arg-AMC
b)
Z-Phe-Arg-AMC
TMP4
TMP4+EK1h
EK
TMP4+EK2h
トリプシン
TMP4+EK3h
ブランク
クマリン数
時間

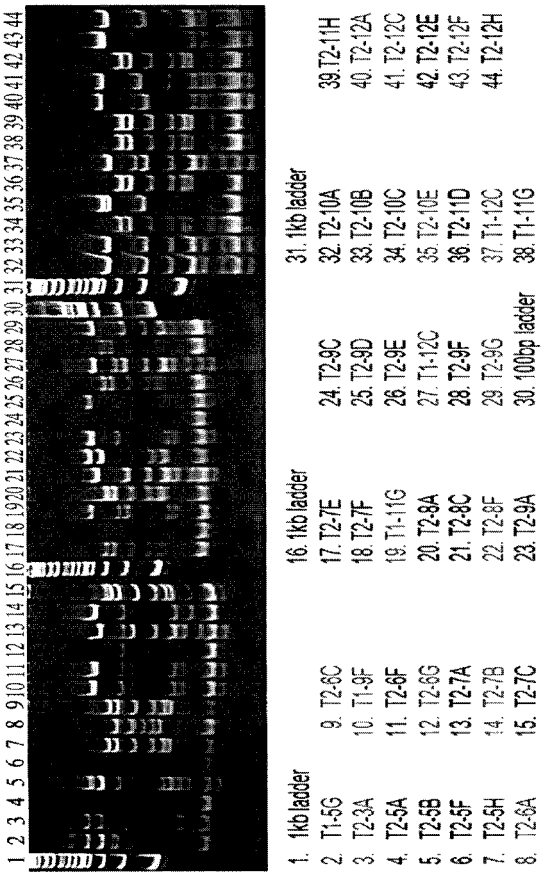
【図５】


1 2 3
75K
50K
Lane1: MW スタンダード
Lane 2: ウサギ正常 IgG
Land3: Ag-purified TMPRSS4-FLAG

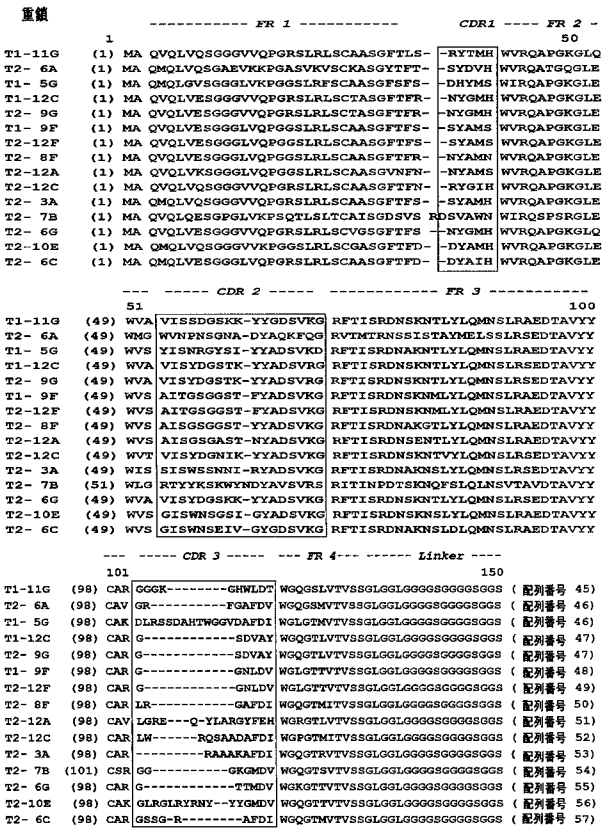
【図６】


(a)
TM-EK
a-myc
His
Lib
1st
2nd
3rd
mono38
(b)
TMPRSS4-flag
a-myc
Flag
Lib
1st
2nd
3rd
38

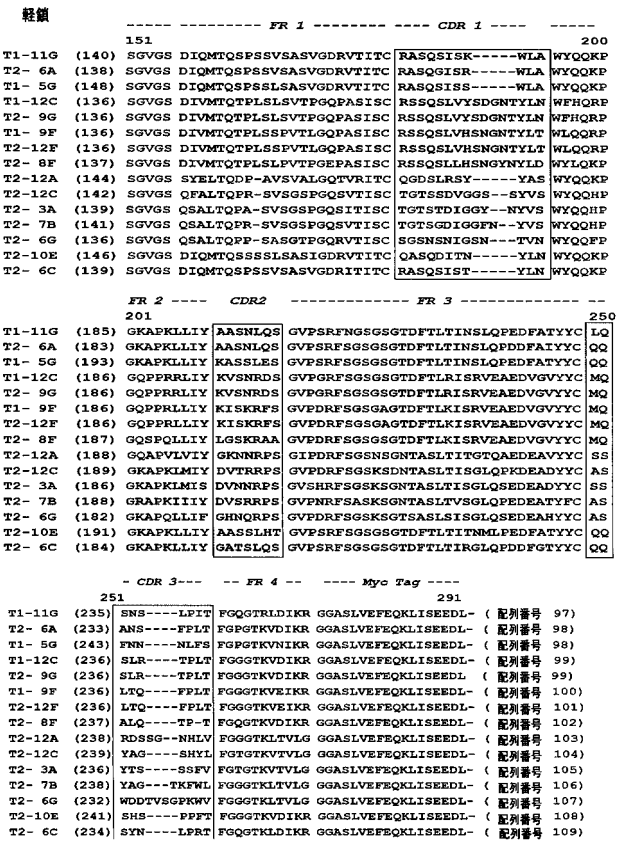
【図７】


1. 1kb ladder
2. T1-5G
3. T2-3A
4. T2-5A
5. T2-5B
6. T2-5F
7. T2-5H
8. T2-6A
9. T2-6C
10. T1-9F
11. T2-6F
12. T2-6G
13. T2-7A
14. T2-7B
15. T2-7C
16. 1kb ladder
17. T2-7E
18. T2-7F
19. T1-11G
20. T2-8A
21. T2-8C
22. T2-8F
23. T2-9A
24. T2-9C
25. T2-9D
26. T2-9E
27. T1-12C
28. T2-9F
29. T2-9G
30. 100bp ladder
31. 1kb ladder
32. T2-10A
33. T2-10B
34. T2-10C
35. T2-10E
36. T2-11D
37. T1-12C
38. T1-11G
39. T2-11H
40. T2-12A
41. T2-12C
42. T2-12E
43. T2-12F
44. T2-12H

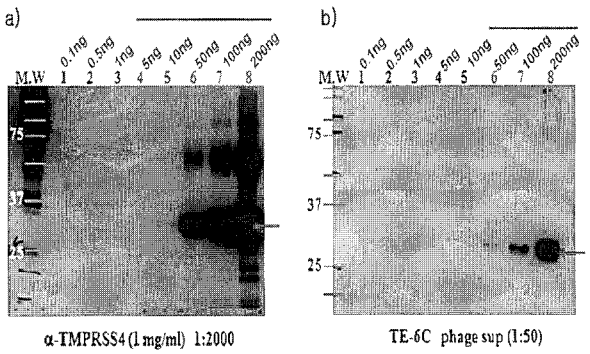
【図８ａ】



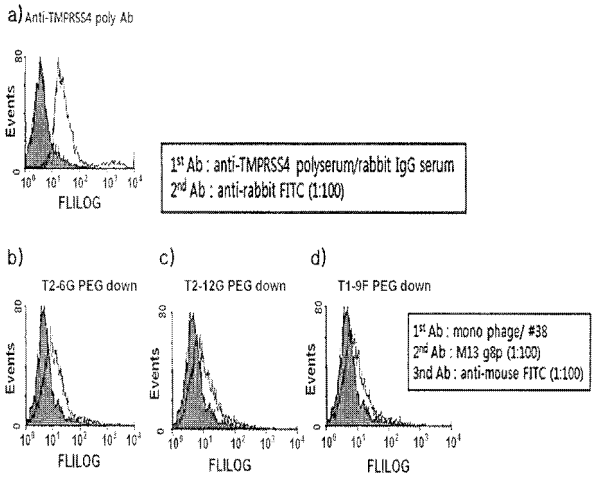
【図８ｂ】



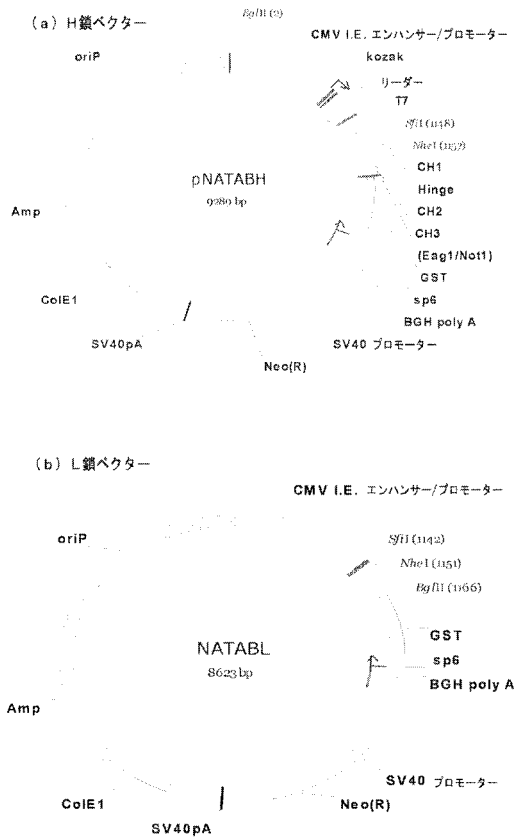
【図９】



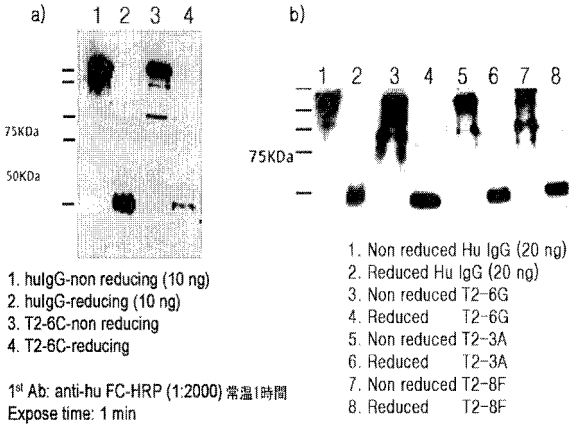
【図１０】



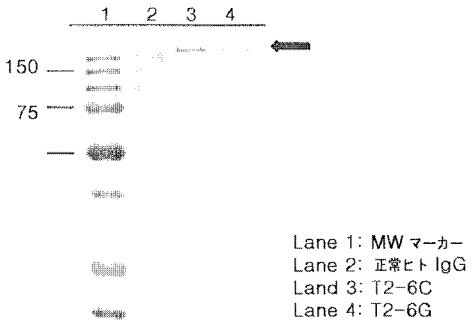
【図１１】



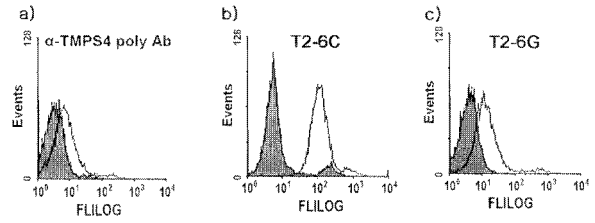
【図１２】



【図１３】



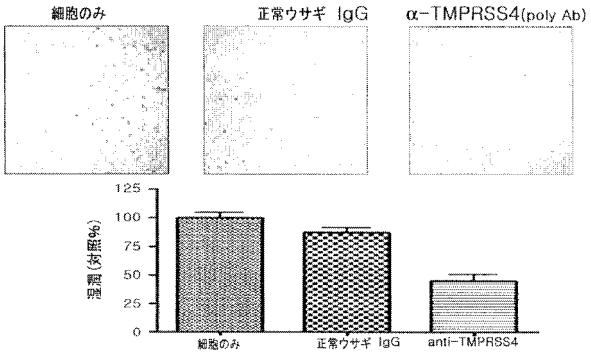
【図１４】



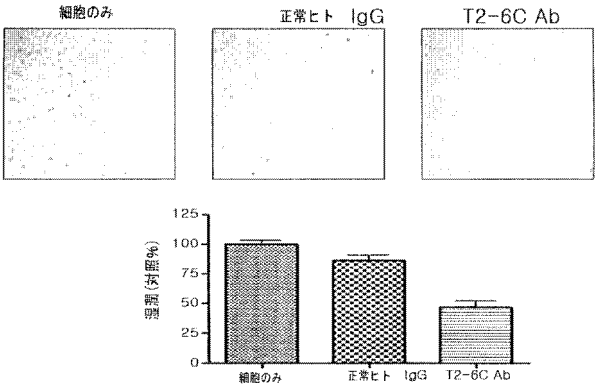
1st Ab: 抗 -TMPRSS4 polyserum(0.5 μg/sample) / ウサギ IgG(0.5 μg/sample)
2nd Ab: 抗ウサギ FITC(1:200)

1st Ab: T2-6C(1 μg) or T2-6G(0.5 μg) / 正常ヒト IgG(1 μg or 0.5 μg, respectively)
2nd Ab: 抗ヒト Fc-FITC(1:200)

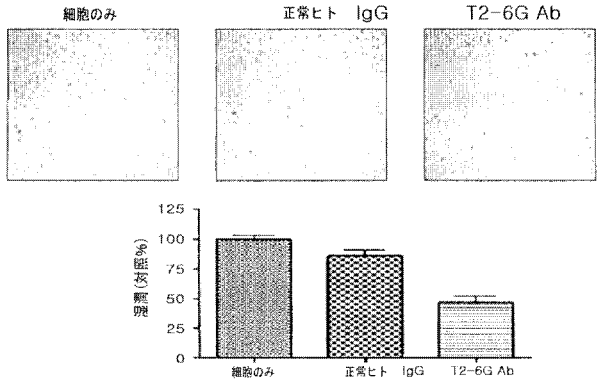
【図１５】



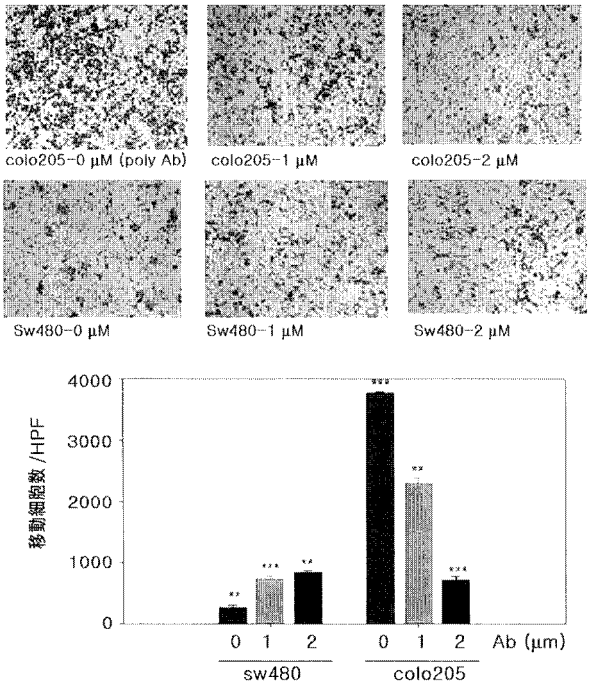
【図１６】



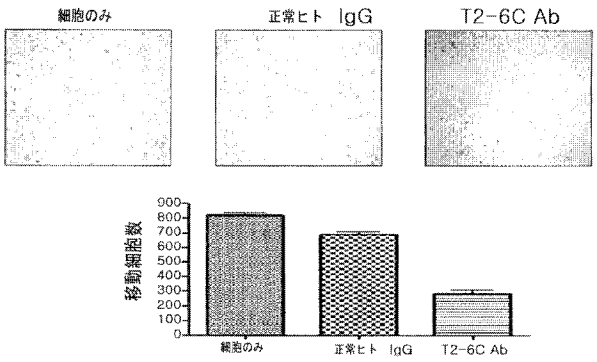
【図１７】



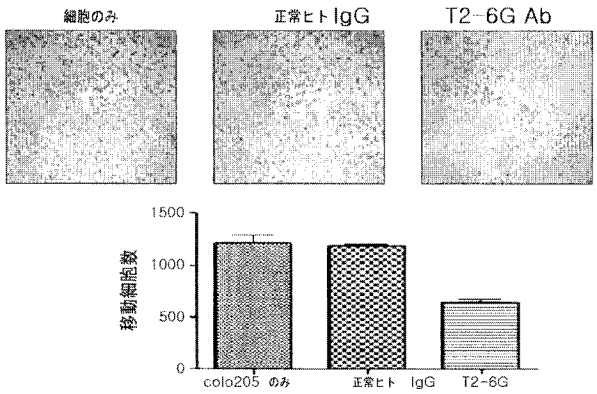
【図１８】



【図１９】



【図２０】



【配列表】
2012505650000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成23年6月14日(2011.6.14)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号７～１８からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域（以下、ＨＣＤＲ）１、配列番号１９～３１からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ２及び配列番号３２～４４からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ３を含む重鎖可変領域（V_H）を含む重鎖、及び、
配列番号５８～７０からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有する軽鎖相補性決定領域（以下、ＬＣＤＲ）１、配列番号７１～８３からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ２及び配列番号８４～９６からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（V_L）を含む軽鎖を含むＴＭＰＲＳＳ４に特異的なヒト抗体。
【請求項２】
前記重鎖可変領域が、配列番号４５～５７からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有することを特徴とする、請求項１に記載のヒト抗体。

【請求項３】
前記軽鎖可変領域が、配列番号９７～１０９からなる群から選択されるいずれか一つのアミノ酸配列を有することを特徴とする、請求項１に記載のヒト抗体。
【請求項４】
請求項１に記載のヒト抗体の重鎖をコーディングするポリヌクレオチド。
【請求項５】
請求項１に記載のヒト抗体の軽鎖をコーディングするポリヌクレオチド。
【請求項６】
請求項１に記載のヒト抗体の重鎖をコーディングするポリヌクレオチドを含む発現ベクター。
【請求項７】
請求項１に記載のヒト抗体の軽鎖をコーディングするポリヌクレオチドを含む発現ベクター。
【請求項８】
請求項６に記載の発現ベクターを宿主細胞に導入して製造された形質転換体。
【請求項９】
請求項７に記載の発現ベクターを宿主細胞に導入して製造された形質転換体。
【請求項１０】
請求項１に記載のヒト抗体の重鎖をコーディングするポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び 請求項１に記載のヒト抗体の軽鎖をコーディングするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを同時に宿主細胞に導入して製造された形質転換体。
【請求項１１】
１）請求項１０に記載の形質転換体を培養する工程、及び
２）前記培養液から請求項１のヒト抗体を精製する工程を含むＴＭＰＲＳＳ４に特異的なヒト抗体の製造方法。

【請求項１２】
請求項１に記載のヒト抗体を含む癌の予防及び治療用薬学的組成物。
【請求項１３】
前記の癌が、大腸癌、肺癌、肝臓癌、膵臓癌、胃癌及び悪性甲状腺腫瘍からなる群から選択されることを特徴とする、請求項１２に記載の薬学的組成物。
【請求項１４】
化学的療法と並行して投与することを特徴とする、請求項１２に記載の薬学的組成物。
【請求項１５】
請求項１に記載のヒト抗体および治療用放射性同位元素を含む癌の放射線免疫治療用薬学的組成物。
【請求項１６】
前記の癌が、大腸癌、肺癌、肝臓癌、膵臓癌、胃癌及び悪性甲状腺腫瘍からなる群から選択されることを特徴とする、請求項１５に記載の薬学的組成物。
【請求項１７】
前記治療用放射性同位元素が、^{3}Ｈ、^{11}Ｃ、^{14}Ｃ、^{18}Ｆ、^{64}Ｃｕ、^{76}Ｂｒ、^{86}Ｙ、^{99m}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{123}Ｉ、^{177}Ｌｕ及びこれらの混合物及び組み合わせからなる群から選択されることを特徴とする、請求項１５に記載の薬学的組成物。
【請求項１８】
前記治療用放射性同位元素が、ヒト抗体と結合されるかヒト抗体が結合された運搬体に含まれることを特徴とする、請求項１５または請求項１７に記載の薬学的組成物。
【請求項１９】
請求項１に記載のヒト抗体、前記ヒト抗体の軽鎖または重鎖の診断的有効量を含む癌の検出用組成物。
【請求項２０】
前記の癌が、大腸癌、肺癌、肝臓癌、膵臓癌、胃癌及び悪性甲状腺腫瘍からなる群から選択されることを特徴とする、請求項１９に記載の癌の検出用組成物。
【請求項２１】
前記ヒト抗体、ヒト抗体の軽鎖または重鎖が、治療用放射線同位元素に直接的にまたは間接的に結合または連結されたことを特徴とする、請求項１９に記載の癌の検出用組成物。
【請求項２２】
前記治療用放射性同位元素が、^{3}Ｈ、^{11}Ｃ、^{14}Ｃ、^{18}Ｆ、^{64}Ｃｕ、^{76}Ｂｒ、^{86}Ｙ、^{99m}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{123}Ｉ、^{177}Ｌｕ及びこれらの混合物及び組み合わせからなる群から選択されることを特徴とする、請求項２１に記載の癌の検出用組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2008/006614

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/18(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)
IPC: C07K 16/18

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Esp@snet, Delphion, Pubmed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007/139260 A1 (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology) (06 December 2007)	1-16, 19-27
A	WO 2004/097034 A2 (Bayer Healthcare AG) (11 November 2004)	1-16, 19-27
A	Jung, H. et al. 'TMPRSS4 promotes invasion, migration and metastasis of human tumor cells by facilitating an epithelial-mesenchymal transition.' Oncogene. Vol. 27(18), pp. 2635-2647 (29 October 2007)	1-16, 19-27
A	Choi, S. Y. et al. 'Role of TMPRSS4 during cancer progression.' Drug News and Perspectives. Vol. 21(8), pp. 417-423 (October 2008)	1-16, 19-27

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 APRIL 2009 (27.04.2009)	**27 APRIL 2009 (27.04.2009)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer KIM, JI YUN Telephone No. 82-42-481-8288

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2008)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2008/006614

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of :

a. type of material
- [x] a sequence listing
- [ ] table(s) related to the sequence listing

b. format of material
- [x] on paper
- [x] in electronic form

c. time of filing/furnishing
- [x] contained in the international application as filed
- [x] filed together with the international application in electronic form
- [ ] furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2008/006614

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 17, 18, 28-30
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Said claims pertain to methods for treatment of the human or animal body, thus relate to a subject-matter which International Searching Authority is not required to search under PCT Art. 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required addtional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2008/006614

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007/139260 A1	06-12-2007	EP 2037939 A1	25-03-2009
		KR 10-2007-0114970 A1	05-12-2007
WO 2004/097034 A2	11-11-2004	WO 2004/097034 A3	16-12-2004

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2008)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*1/21*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21		４Ｈ０４５
Ｃ１２Ｎ	*5/10*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/00	１０１	
Ａ６１Ｋ	*39/395*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｅ	
Ａ６１Ｋ	*51/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｔ	
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	43/00		
			Ａ６１Ｐ	35/00		
			Ａ６１Ｋ	49/02	Ａ	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 チョイ ソーヨン
大韓民国 ３０５‐７４４ テジョン ユソンーグ グァンピョンードン サンヨンスイートドットホーム ＃４０２－１１０１
(72)発明者 ジャン ヨンースン
大韓民国 ３０５‐７２１ テジョン ユソンーグ シンソンードン ラッキーハナ ＃１０３‐１０５
(72)発明者 パク ジヒョン
大韓民国 ３０５‐７５９ テジョン ユソンーグ ハギードン ソンニムマウル ４ダンジ アパートメント ＃４０７‐２０６
(72)発明者 ソン ウンージョン
大韓民国 ３００‐３１０ テジョン ドンーグ ビリョンードン ２０２‐４
(72)発明者 ユ ジョン
大韓民国 ３０１‐１４０ テジョン ジュンーグ ユチョンードン ヒュンダイ アパートメント ＃１０４‐５０１
(72)発明者 ソン ミョンーホ
大韓民国 ３００‐３１０ テジョン ドンーグ ビリョンードン ２０２‐４
(72)発明者 ジョン ジェウォン
大韓民国 ３０５‐７４４ テジョン ユソンーグ グァンピョンードン サンヨンスイートドットホーム ４０１‐３０１
(72)発明者 ジョン ジュンーグ
大韓民国 ３０２‐２０８ テジョン ソーグ ウォルピョンードン １５５ フロア ３
(72)発明者 キム ソンソブ
大韓民国 ３０５‐７６１ テジョン ユソンーグ ジョンミンードン エキスポ アパートメント ＃３０７－１４０４
(72)発明者 ジャン ミョンヒ
大韓民国 ３０６‐８２６ テジョン テドクーグ ジョンニードン ２３９‐５ ＃４０２

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA53 CA04 CA20 DA02 EA03 GA11
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA93X AA98X AB01 AC14 BA02 BB03
BB15 BB37 BC03 CA25 CA44 CA46
4C084 AA03 AA12 MA02 MA52 MA66 NA05 ZB262
4C085 AA13 AA14 AA16 AA17 BB11 CC02 CC21 CC23 DD62 EE01

EE03 GG02 GG04 GG06 GG08 HH03 KA03 KA29 KB02 KB07
KB09 KB11 KB18 KB19 KB20 LL18
4H045 AA11 DA76 EA20 EA50 FA74 GA30