

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 10 月 27 日(27.10.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/171242 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/062719
- (22) 国際出願日: 2016 年 4 月 22 日(22.04.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-089156 2015 年 4 月 24 日(24.04.2015) JP
- (71) 出願人: 第一三共株式会社(DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 須江 真由美(SUE, Mayumi); 〒1408710 東京都品川区広町 1 丁目 2 番 5 8 号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 渋谷 朋子(SHIBUTANI, Tomoko); 〒1408710 東京都品川区広町 1 丁目 2 番 5 8 号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 和田 悌司(WADA, Teiji); 〒1408710 東京都品川区広町 1 丁目 2 番 5 8 号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 徳廣 臣哉(TOKUHIRO, Shinya); 〒1408710 東京都品川区広町 1 丁目 2 番 5 8 号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 石橋 公樹, 外(ISHIBASHI, Koki et al.); 〒1400005 東京都品川区広町一丁目 2 番 5 8 号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: DETECTION OF EPHA2

(54) 発明の名称: E P H A 2 の検出

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide an antibody capable of binding to human EPHA2, a medicinal composition comprising the antibody, a diagnostic composition comprising the antibody, etc.

(57) 要約: ヒト E P H A 2 に結合する抗体、または該抗体を含む医薬組成物または診断組成物等を提供することにある。



WO 2016/171242 A1

明 細 書

発明の名称：E P H A 2 の検出

技術分野

[0001] 本発明は、新規な抗体、該抗体の機能断片、該抗体の修飾体、該抗体の有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むヌクレオチド、該ヌクレオチドが挿入されたベクター、該ヌクレオチドまたはベクターが導入された細胞、該細胞を培養する工程を含む該抗体の製造方法、医薬組成物、診断用または検査用組成物等に関する。

背景技術

[0002] E P H A 2 は、分子量 1 3 0 k D a の 1 回膜貫通構造を有するレセプター型チロシンキナーゼである（非特許文献 1）。E P H A 2 の N 末端側の細胞外領域には、リガンド結合ドメインと 2 ヶ所のフィブロネクチンタイプ 3 ドメインが存在し、C 末端側の細胞内領域にはチロシンキナーゼドメインと s t e r i l e - α - m o t i f (S A M) ドメインが存在している。

[0003] E P H A 2 のリガンドとして、G P I アンカー型細胞表面蛋白質の E p h r i n - A 1 ~ A 5 が知られている（非特許文献 2）。リガンド結合による E P H A 2 のチロシンキナーゼドメインの活性化により、E P H A 2 の細胞内領域に存在するチロシン残基が自己リン酸化され、細胞内シグナルの伝達が誘導される。また、リガンドと結合した後に E P H A 2 はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、最終的にプロテアソームで分解されることが報告されている（非特許文献 3）。

[0004] E P H A 2 は臨床的に多くの癌、特に乳癌、食道癌、前立腺癌、胃癌、非小細胞肺癌、大腸癌、多形神経膠芽腫での高発現が報告されている（非特許文献 4、5、6、7、8、9、10、11）。さらに、食道癌では、E P H A 2 発現と局所リンパ節転移、リンパ節転移の数、及び癌の分化度の低さとの間に有意な相関が観察されており、E P H A 2 陽性の患者の生存率は E P H A 2 陰性の患者に比べて低いことが報告されている（非特許文献 5）。非

小細胞肺癌では、無病生存期間が5年より長い患者に比べ5年未満の患者ではE P H A 2の発現レベルが高いこと、再発した患者は再発のない患者に比べてE P H A 2の発現レベルが高いこと、脳転移へ進行した患者では、再発のない患者や転移が対側の肺に限局している患者に比べてE P H A 2の発現レベルが高いことが報告されている（非特許文献9）。大腸癌においてもE P H A 2の発現レベルが、肝転移、リンパ管浸潤及び臨床ステージと有意に相関することが報告されている（非特許文献10）。

[0005] また、E P H A 2遺伝子を細胞に導入することによって、非癌細胞が足場非依存的増殖能や細胞外基質上での管状形態形成能、*in vivo*での腫瘍増殖能といった癌形質を獲得することになること（非特許文献4）、癌細胞の細胞外基質に対する浸潤性が亢進すること（非特許文献12、13）が報告されている。逆にE P H A 2の発現を*siRNA*で抑制すると癌細胞の浸潤性や足場非依存的増殖、*in vivo*での腫瘍増殖が抑制されること（非特許文献13、14）、および、リガンドであるE p h r i n - A 1とヒトI g GのF c領域との融合蛋白質を使用してE P H A 2を活性化し、エンドサイトーシスによるE P H A 2の分解を誘導することで癌細胞の浸潤性や足場非依存的増殖、管状形態形成能が抑制されること（非特許文献4、11、12）が報告されている。

[0006] 一方でE P H A 2は、癌細胞のみならず腫瘍内または腫瘍周囲の血管にも発現していることが報告されている（非特許文献15）。マウスにおいてはE p h r i n - A 1によって誘導される血管新生にE P H A 2シグナルが関与していること、特に血管内皮細胞に発現するE P H A 2が血管内皮細胞の管腔形成や生存に必要とされることが報告されており（非特許文献16）、E P H A 2の細胞外領域とヒトI g GのF c領域との融合蛋白質が*in vivo*で血管新生を抑制し、抗腫瘍効果を示すことも報告されている（非特許文献17）。

[0007] 以上より、E P H A 2が癌に対する優れた治療標的となる可能性が示唆されており、実際にE P H A 2に対するモノクローナル抗体が取得され、臨床

試験が実施されているものも存在する（特許文献1乃至3）。

[0008] これらこのことから、E P H A 2の発現を検出できる方法の提供は、癌などE P H A 2に関わる疾患、E P H A 2発現の検査または診断に有用である。

[0009] ヒトE P H A 2を認識するモノクローナル抗体は多数知られているが、免疫組織染色への適用が可能とされるものは少なく、さらにホルマリンで固定した変性型E P H A 2認識による免疫組織染色が可能とされるモノクローナル抗体としては、僅かにクローンD 7やB 2 D 6（非特許文献18）が知られているに過ぎなかった。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：国際公開第WO 2003/094859号パンフレット

特許文献2：国際公開第WO 2006/084226号パンフレット

特許文献3：国際公開第WO 2009/028639号パンフレット

非特許文献

[0011] 非特許文献1：Molecular and Cellular Biology、1990年、第10巻、p. 6316-6324

非特許文献2：Annual Review of Neuroscience、1998年、第21巻、p. 309-345

非特許文献3：Molecular Cancer Research、2002年、第1巻、p. 79-87

非特許文献4：Cancer Research、2001年、第61巻、p. 2301-2306

非特許文献5：International Journal of Cancer、2003年、第103巻、p. 657-663

非特許文献6：The Prostate、1999年、第41巻、p. 275-280

非特許文献7：American Journal of Patholog

y、2003年、第163巻、p. 2271-2276

非特許文献8: Cancer Science、2005年、第96巻、p. 42-47

非特許文献9: Clinical Cancer Research、2003年、第9巻、p. 613-618

非特許文献10: Oncology Reports、2004年、第11巻、p. 605-611

非特許文献11: Molecular Cancer Research、2005年、第3巻、p. 541-551

非特許文献12: Biochemical and Biophysical Research Communications、2004年、第320巻、p. 1096-1102

非特許文献13: Oncogene、2004年、第23巻、p. 1448-1456

非特許文献14: Cancer Research、2002年、第62巻、p. 2840-2847

非特許文献15: Oncogene、2000年、第19巻、p. 6043-6052

非特許文献16: Journal of Cell Science、2004年、第117巻、p. 2037-2049

非特許文献17: Oncogene、2002年、第21巻、p. 7011-7026

非特許文献18: Prostate、1999年、第41巻、p. 275-280

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明の一つの課題は、E P H A 2に対する抗体を提供することである。

[0013] 本発明の他の一つの課題は抗E P H A 2抗体を含有する診断または検査用

組成物等を提供することである。

[0014] また、本発明の課題には、該抗体が有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド、該ヌクレオチドが挿入されたベクター、該ヌクレオチドまたはベクターが導入された細胞、該細胞を培養する工程を含む該抗体の製造方法等が含まれる。

[0015] さらに、本発明の他の一つの課題は、医薬組成物および治療方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0016] 発明者は上記課題を解決するために鋭意、検討を行い、新規な抗E P H A 2抗体を創出し、該抗体を用いてE P H A 2を検出できることを見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は、以下の発明を包含する。

(1) 重鎖配列が、C D R H 1、C D R H 2、C D R H 3を有する可変領域を含み、前記C D R H 1は配列番号60に示されるアミノ酸配列からなり、前記C D R H 2は配列番号61に示されるアミノ酸配列からなり、前記C D R H 3は配列番号62に示されるアミノ酸配列からなること；

軽鎖配列が、C D R L 1、C D R L 2、C D R L 3を有する可変領域を含み、前記C D R L 1は配列番号63に示されるアミノ酸配列からなり、前記C D R L 2は配列番号64に示されるアミノ酸配列からなり、前記C D R L 3は配列番号65に示されるアミノ酸配列からなること；および配列番号2に示されるE P H A 2に特異的に結合すること；

を特徴とする抗体または該抗体の抗原結合性断片、

(2) 配列番号51に示されるアミノ酸配列の20乃至137番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列および配列番号54に示されるアミノ酸配列の20乃至128番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする(1)に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片、

(3) 配列番号51に示されるアミノ酸配列の20乃至137番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列および配列番号54に示されるアミノ酸配列の20乃至128番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含み、

重鎖定常領域のアイソタイプが I g G 1であることを特徴とする (1) または (2) に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片、

(4) 重鎖配列が、C D R H 1、C D R H 2、C D R H 3を有する可変領域を含み、前記C D R H 1は配列番号66に示されるアミノ酸配列からなり、前記C D R H 2は配列番号67に示されるアミノ酸配列からなり、前記C D R H 3は配列番号68に示されるアミノ酸配列からなること；

軽鎖配列が、C D R L 1、C D R L 2、C D R L 3を有する可変領域を含み、前記C D R L 1は配列番号69に示されるアミノ酸配列からなり、前記C D R L 2は配列番号70に示されるアミノ酸配列からなり、前記C D R L 3は配列番号71に示されるアミノ酸配列からなること；および

配列番号2に示されるE P H A 2に特異的に結合すること；

を特徴とする抗体または該抗体の抗原結合性断片、

(5) 配列番号57に示されるアミノ酸配列の20乃至138番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列および配列番号59に示されるアミノ酸配列の20乃至133番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする (4) に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片、

(6) 配列番号57に示されるアミノ酸配列の20乃至138番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列および配列番号59に示されるアミノ酸配列の20乃至133番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含み、重鎖定常領域のアイソタイプが I g G 2 bであることを特徴とする (4) または (5) に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片、

(7) F a b、F (a b') 2、F a b' およびF vからなる群から選択される、(1)、(2)、(4) または (5) のいずれか一つに記載の抗体の抗原結合性断片、

(8) s c F vであることを特徴とする、(1)、(2)、(4) または (5) のいずれか一つに記載の抗体、

(9) (1) 乃至 (8) のいずれか一つに記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片を含む組成物、

(10) (1) 乃至 (8) のいずれか一つに記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片を含み、パラフィン包埋処理した後脱パラフィン処理した組織標本（以下、単に「標本」という。）中のE P H A 2の検出または測定方法に使用される、(9)に記載の組成物、

(11) (1) 乃至 (8) のいずれか一つに記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片と被検標本を接触させる工程を含む、標本中のE P H A 2の検出または測定方法に使用される、請求項(9)または(10)に記載の組成物、

(12) E P H A 2の検出または測定方法が、被検標本においてE P H A 2が検出もしくは測定されたか、または被検標本におけるE P H A 2の発現レベルもしくは発現量が事前に決定された基準と同等かまたはそれより高い場合、該被検標本を陽性と判定し、被検標本においてE P H A 2が検出もしくは測定されなかったか、または被検標本におけるE P H A 2の発現レベルもしくは発現量が事前に決定された基準と同等かまたはそれより低い場合、該被検標本を陰性と判定する工程を含む、(11)に記載の組成物、

(13) E P H A 2陽性疾患の検査または診断方法に使用される、(9)乃至(12)のいずれか一つに記載の組成物、

(14) E P H A 2陽性疾患の検査または診断方法が、E P H A 2の検出または測定において、陽性と判定された被検標本が由来する被験者は、E P H A 2に特異的に結合する抗体もしくは該抗体の抗原結合性断片を投与する工程を含むE P H A 2陽性疾患の治療または予防方法に適していると判定し、陰性と判定された被検標本が由来する被験者は、E P H A 2に特異的に結合する抗体もしくは該抗体の抗原結合性断片を投与する工程を含むE P H A 2陽性疾患の治療または予防方法には適していないと判定することを含む、(13)に記載の組成物、

(15) E P H A 2陽性疾患がE P H A 2陽性癌である、(13)または(14)に記載の組成物、

(16) 下記(i)乃至(iii)のいずれか一つに記載の被験者に投与さ

れる、E P H A 2 に特異的に結合する抗体もしくは該抗体の抗原結合性断片を含む医薬組成物：

(i) (9) 乃至 (1 1) または (1 3) のいずれか一つに記載の組成物を用いて E P H A 2 が検出または測定された被検標本の由来する被験者；

(i i) (1 2) に記載の組成物を用いた E P H A 2 の検出または測定において陽性と判定された被検標本の由来する被験者；

(i i i) (1 4) または (1 5) に記載の組成物を用いて、E P H A 2 に特異的に結合する抗体もしくは該抗体の抗原結合性断片を投与する工程を含む E P H A 2 陽性疾患の治療または予防に適していると判定された被験者、

(1 7) (1) 乃至 (8) のいずれか一つに記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片をコードするポリヌクレオチド、

(1 8) (1 7) に記載のポリヌクレオチドを含むベクター、

(1 9) (1 7) に記載のポリヌクレオチドまたは (1 8) に記載のベクターを含む細胞、

(2 0) 下記の工程 (i) および (i i) を含む、(1) 乃至 (8) のいずれか一つに記載のモノクローナル抗体または該抗体の抗原結合性断片の製造方法：

(i) (1 9) に記載の細胞を培養する工程；

(i i) 工程 (i) の培養物からモノクローナル抗体または該抗体の抗原結合性断片を回収する工程、

(2 1) 抗体がモノクローナル抗体である、(1) 乃至 (8) のいずれか一つに記載の抗体又はその抗原結合性断片、

(2 2) 下記の工程 (i) 、または (i) および (i i) を含む、E P H A 2 の検出または測定方法：

(i) (1) 乃至 (8) のいずれか一つに記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片又は (9) に記載の組成物と被検標本を接触させる工程；

(i i) 該被検標本において E P H A 2 が検出もしくは測定されたか、または該被検標本における E P H A 2 の発現レベルもしくは発現量が事前に決定

された基準と同等かまたはそれより高い場合、該被検標本を陽性と判定し、被検標本においてE P H A 2が検出もしくは測定されなかったか、また該被検標本におけるE P H A 2の発現レベルもしくは発現量が事前に決定された基準と同等かまたはそれより低い場合、該被検標本を陰性と判定する工程、

(23) 下記の工程(i)、または(i)および(ii)を含む、E P H A 2に特異的に結合する抗体もしくは該抗体の抗原結合性断片を含む医薬組成物を投与する個体の同定方法：

(i) (1)乃至(8)のいずれか一つに記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片又は(9)に記載の組成物と個体由来のサンプルを接触させる工程；

(ii) 該個体由来のサンプルにおいてE P H A 2が検出もしくは測定されたか、または該個体由来のサンプルにおけるE P H A 2の発現レベルもしくは発現量が事前に決定された基準と同等かまたはそれより高い場合、該個体を陽性と判定し、被検標本においてE P H A 2が検出もしくは測定されなかったか、また該個体由来のサンプルにおいてE P H A 2が検出もしくは測定されなかったか、また該個体由来のサンプルにおけるE P H A 2の発現レベルもしくは発現量が事前に決定された基準と同等かまたはそれより低い場合、該個体を陰性と判定する工程、

(24) E P H A 2陽性疾患の検査または診断方法に使用される、(22)または(23)に記載の方法、

(25) E P H A 2陽性疾患を罹患しているもしくはそのリスクがある個体の同定方法に使用される、(23)に記載の方法、

(26) (16)の(i)乃至(iii)のいずれか一つに記載の被験者に対し、E P H A 2に特異的に結合する抗体もしくは該抗体の抗原結合性断片を含む医薬組成物を投与することを含む、E P H A 2陽性疾患の治療方法、

(27) (1)乃至(8)のいずれか一つに記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片を含む、E P H A 2陽性疾患を検査または診断するためのキット、

および、

(28) EPHA2陽性疾患がEPHA2陽性癌である、(24)乃至(26)に記載の方法または(27)に記載のキット、等に関する。

図面の簡単な説明

[0017] [図1] 293F細胞にトランスフェクションされた遺伝子の発現灰色点線、灰色実線はそれぞれ、pFLAG-GWでトランスフェクションされた293F細胞に対するアイソタイプコントロール抗体、抗FLAG抗体の結合を示す。黒色点線、黒色実線はそれぞれ、図1に示された遺伝子でトランスフェクションされた293F細胞に対するアイソタイプコントロール抗体、抗FLAG抗体の結合を示す。

[図2] フローサイトメトリーによるマウス抗ヒトEPHA2抗体A201の結合特異性評価灰色点線、灰色実線はそれぞれ、pFLAG-GWでトランスフェクションされた293F細胞に対するアイソタイプコントロール抗体、A201抗体の結合を示す。黒色点線、黒色実線はそれぞれ、図2に示された遺伝子でトランスフェクションされた293F細胞に対するアイソタイプコントロール抗体、A201抗体の結合を示す。

[図3] フローサイトメトリーによるマウス抗ヒトEPHA2抗体A205の結合特異性評価灰色点線、灰色実線はそれぞれ、pFLAG-GWでトランスフェクションされた293F細胞に対するアイソタイプコントロール抗体、A205抗体の結合を示す。黒色点線、黒色実線はそれぞれ、図3に示された遺伝子でトランスフェクションされた293F細胞に対するアイソタイプコントロール抗体、A205抗体の結合を示す。

[図4] 実施例5に係るマウス抗ヒトEPHA2抗体A201およびA205のEPHA2特異的結合性を示す図である。

[図5] 実施例5に係るヒト咽喉頭癌および胃癌のマウス抗ヒトEPHA2抗体A201による免疫染色像である。

[図6] 実施例5に係るヒト咽喉頭癌および胃癌のマウス抗ヒトEPHA2抗体

A205による免疫染色像である。

[図7]マウス抗ヒトE P H A 2抗体A201の重鎖のアミノ酸配列（配列番号51）およびこれをコードするヌクレオチド配列（配列番号50）を示した図である。

[図8]マウス抗ヒトE P H A 2抗体A201の軽鎖のアミノ酸配列（配列番号54）およびこれをコードするヌクレオチド配列（配列番号53）を示した図である。

[図9]マウス抗ヒトE P H A 2抗体A205の重鎖のアミノ酸配列（配列番号57）およびこれをコードするヌクレオチド配列（配列番号56）を示した図である。

[図10]マウス抗ヒトE P H A 2抗体A205の軽鎖のアミノ酸配列（配列番号59）およびこれをコードするヌクレオチド配列（配列番号58）を示した図である。

[図11]マウス抗ヒトE P H A 2抗体A201の有するC D Rのアミノ酸配列（配列番号60乃至65）を示した図である。

[図12]マウス抗ヒトE P H A 2抗体A205の有するC D Rのアミノ酸配列（配列番号66乃至71）を示した図である。

[図13]実施例6に係るマウス抗ヒトE P H A 2抗体A201およびA205、市販抗E P H A 2抗体の免疫組織化学染色における性能の比較を示す図である。

[図14]実施例6に係るE P H A 2非発現293 α 細胞、E P H A 2発現293 α 細胞、およびE P H A 2内因性発現MDA-MB-231細胞のマウス抗ヒトE P H A 2抗体A201およびA205、市販抗E P H A 2抗体による免疫染色像である。

[図15]実施例6に係るヒト食道癌のマウス抗ヒトE P H A 2抗体A201およびA205、R & D S y s t e m s社ヤギ抗E P H A 2ポリクローナル抗体（A F 3 0 3 5）、ならびにS a n t a C r u z社ウサギ抗E P H A 2ポリクローナル抗体（s c - 9 2 4）による免疫染色像である。

[図16]実施例6に係るヒト子宮頸癌のマウス抗E P H A 2抗体A 2 0 1およびA 2 0 5、R & D S y s t e m s社ヤギ抗E P H A 2ポリクローナル抗体（A F 3 0 3 5）、ならびにS a n t a C r u z社ウサギ抗E P H A 2ポリクローナル抗体（s c - 9 2 4）による免疫染色像である。

[図17]実施例6に係るヒト大腸癌のマウス抗E P H A 2抗体A 2 0 1およびA 2 0 5、R & D S y s t e m s社ヤギ抗E P H A 2ポリクローナル抗体（A F 3 0 3 5）、ならびにS a n t a C r u z社ウサギ抗E P H A 2ポリクローナル抗体（s c - 9 2 4）による免疫染色像である。

[図18]実施例6に係るヒト胃癌のマウス抗E P H A 2抗体A 2 0 1およびA 2 0 5、R & D S y s t e m s社ヤギ抗E P H A 2ポリクローナル抗体（A F 3 0 3 5）、ならびにS a n t a C r u z社ウサギ抗E P H A 2ポリクローナル抗体（s c - 9 2 4）による免疫染色像である。

発明を実施するための形態

[0018] 1. 定義

本発明において、「遺伝子」とは、蛋白質のアミノ酸をコードする塩基配列が含まれるヌクレオチドまたはその相補鎖を意味し、例えば、蛋白質のアミノ酸をコードする塩基配列が含まれるヌクレオチドまたはその相補鎖であるポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、DNA、mRNA、cDNA、cRNA等は「遺伝子」の意味に含まれる。かかる遺伝子は一本鎖、二本鎖または三本鎖以上のヌクレオチドであり、DNA鎖とRNA鎖の会合体、一本のヌクレオチド鎖上にリボヌクレオチド（RNA）とデオキシリボヌクレオチド（DNA）が混在するものおよびそのようなヌクレオチド鎖を含む二本鎖または三本鎖以上のヌクレオチドも「遺伝子」の意味に含まれる。本発明の「E P H A 2 遺伝子」としては、例えば、E P H A 2 蛋白質のアミノ酸配列をコードする塩基配列が含まれるDNA、mRNA、cDNA、cRNA等をあげることができる。

[0019] 本発明において、「ヌクレオチド」と「核酸」は同義であり、例えば、DNA、RNA、プローブ、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、プライ

マー等も「ヌクレオチド」の意味に含まれる。かかるヌクレオチドは一本鎖、二本鎖または三本以上の鎖からなるヌクレオチドであり、DNA鎖とRNA鎖の会合体、一本のヌクレオチド鎖上にリボヌクレオチド（RNA）とデオキシリボヌクレオチド（DNA）が混在するものおよびそのようなヌクレオチド鎖を含む二本鎖または三本以上の鎖の会合体も「ヌクレオチド」の意味に含まれる。

[0020] 本発明において、「ポリペプチド」、「ペプチド」および「蛋白質」は同義である。

[0021] 本発明において、「抗原」を「免疫原」の意味に用いることがある。

[0022] 本発明において、「細胞」には、動物個体に由来する各種細胞、継代培養細胞、初代培養細胞、細胞株、組換え細胞および微生物等も含まれる。

[0023] 本発明においては、E P H A 2を認識する抗体を、それぞれ「抗E P H A 2抗体」と表記することがある。かかる抗体には、キメラ化抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体等が含まれる。

[0024] 本発明における「抗体の機能断片」とは、元の抗体が奏する機能の少なくとも一部を奏する抗体断片を意味する。「抗体の機能断片」としては、例えば、F a b、F (a b') 2、s c F v、F a b'、一本鎖免疫グロブリン等をあげることができるが、それらに限定されるものではない。かかる抗体の機能断片は、抗体蛋白質の全長分子をパパイン、ペプシン等の酵素で処理することによって得られたものに加え、組換え遺伝子を用いて適当な宿主細胞において産生された組換え蛋白質であってもよい。

[0025] 本発明において、抗体が結合する「部位」、すなわち抗体が認識する「部位」とは、抗体が結合または認識する抗原上の部分ペプチドまたは部分高次構造を意味する。本発明においては、かかる部位のことをエпитープ、抗体の結合部位とも呼ぶ。本発明の抗E P H A 2抗体が結合または認識するE P H A 2蛋白質上の部位としては、E P H A 2蛋白質上の部分ペプチドまたは部分高次構造等を例示することができる。

[0026] 抗体分子の重鎖および軽鎖にはそれぞれ3箇所の相補性決定領域（C D R

: Complementarity determining region) があることが知られている。相補性決定領域は、超可変領域 (hyper variable domain) とも呼ばれ、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域内にあって、一次構造の変異性が特に高い部位であり、重鎖および軽鎖のポリペプチド鎖の一次構造上において、通常、それぞれ3ヶ所に分離している。本発明においては、抗体の相補性決定領域について、重鎖の相補性決定領域を重鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からCDRH1、CDRH2、CDRH3と表記し、軽鎖の相補性決定領域を軽鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からCDRL1、CDRL2、CDRL3と表記する。これらの部位は立体構造の上で相互に近接し、結合する抗原に対する特異性を決定している。

[0027] 本発明において、「抗体変異体」とは、元の抗体が有するアミノ酸配列においてアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入（以下、「変異」と総称する）してなるアミノ酸配列を有し、且つ本発明のEPHA2蛋白質に結合するポリペプチドを意味する。かかる抗体変異体における変異アミノ酸の数は、1乃至2個、1乃至3個、1乃至4個、1乃至5個、1乃至6個、1乃至7個、1乃至8個、1乃至9個、1乃至10個、1乃至12個、1乃至15個、1乃至20個、1乃至25個、1乃至30個、1乃至40個または1乃至50個である。かかる抗体変異体も本発明の「抗体」に包含される。

[0028] 本発明において、「1乃至数個」における「数個」とは、3乃至10個を指す。

[0029] 本発明の抗体が奏する活性・性質としては、例えば、生物活性、理化学的性質等を挙げることができ、具体的には、各種生物活性、抗原やエピトープに対する結合活性、製造や保存時における安定性、熱安定性等をあげることができる。

[0030] 本発明において、「ストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする」とは、5×SSCを含む溶液中で65℃にてハイブリダイゼーションを行い、

ついで $2 \times \text{SSC} - 0.1\% \text{SDS}$ を含む水溶液中で 65°C にて 20 分間、
 $0.5 \times \text{SSC} - 0.1\% \text{SDS}$ を含む水溶液中で 65°C にて 20 分間、な
らびに、 $0.2 \times \text{SSC} - 0.1\% \text{SDS}$ を含む水溶液中で 65°C にて 20
分間、それぞれ洗浄する条件またはそれと同等の条件でハイブリダイズする
ことを意味する。SSC とは $150 \text{ mM NaCl} - 15 \text{ mM}$ クエン酸ナトリ
ウムの水溶液であり、 $n \times \text{SSC}$ は n 倍濃度の SSC を意味する。

[0031] 本発明において「細胞傷害」とは、何らかの形で、細胞に病理的な変化を
もたらすことを指し、直接的な外傷にとどまらず、DNA の切断や塩基の二
量体の形成、染色体の切断、細胞分裂装置の損傷、各種酵素活性の低下など
あらゆる細胞の構造や機能上の損傷を意味する。

[0032] 本発明において「細胞傷害活性」とは上記細胞傷害を引き起こすことを意
味する。本発明において「抗体依存性細胞傷害活性」とは、「antibody
dependent cellular cytotoxicity
(ADCC) 活性」を指し、NK 細胞が抗体を介して腫瘍細胞等の標的細胞
を傷害する作用活性を意味する。

[0033] 本発明において「抗体依存性細胞媒介食活性」とは、「antibody
dependent cell phagocytosis (ADCP)
活性」を指し、単球やマクロファージ細胞が抗体を介して腫瘍細胞等の標的
細胞を貪食する作用活性を意味する。「抗体依存的貪食作用活性」ともいう
。

[0034] 本発明において「補体依存性細胞傷害作用活性」とは、「complement
dependent cytotoxicity (CDC) 活性」
を指し、補体が抗体を介して腫瘍細胞等の標的細胞を傷害する作用活性を意
味する。

[0035] 本発明において「癌」と「腫瘍」は同じ意味で用いられる。

[0036] 本発明において「免疫組織化学 (immunohistochemistry: IHC)」とは組織標本中の抗原を検出する組織学的 (組織化学的)
手法を意味し、「免疫抗体法」と同義であり、「免疫染色 (immunostaining)」

t a i n i n g)」も同じ意味に用いられる。

[0037] 本発明において「変性型」E P H A 2とは、ホルマリンで固定した標本中のE P H A 2分子を意味する。ホルマリンで固定した後にパラフィン処理および脱パラフィン処理した標本中のE P H A 2分子も「変性型」E P H A 2という。

[0038] 本発明において「非変性型」E P H A 2とは、ホルマリンで固定していないサンプル中のE P H A 2を意味する。ホルマリンで固定していない標本中のE P H A 2分子も「非変性型」E P H A 2という。

[0039] 2. E P H A 2

本発明で用いるE P H A 2は、ヒト、ヒト以外の哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）あるいはニワトリのT細胞あるいは肥満細胞から直接精製して使用するか、あるいは上記の細胞の細胞膜画分を調製して使用することができ、また、E P H A 2を*i n v i t r o*にて合成する、あるいは遺伝子操作により宿主細胞に産生させることによって得ることができる。遺伝子操作では、具体的には、E P H A 2 c D N Aを発現可能なベクターに組み込んだ後、転写と翻訳に必要な酵素、基質およびエネルギー物質を含む溶液中で合成する、あるいは他の原核生物、または真核生物の宿主細胞を形質転換させることによってE P H A 2を発現させることにより、該蛋白質を得ることが出来る。

[0040] ヒトE P H A 2のc D N Aのヌクレオチド配列は、G e n B a n k にアクセス番号：N M _ 0 0 4 4 3 1で登録されている。また、ヒトE P H A 2のアミノ酸配列は、G e n B a n k にアクセス番号：N P _ 0 0 4 4 2 2で登録されている。

[0041] E P H A 2のc D N Aは例えば、E P H A 2のm R N Aを発現している臓器のc D N Aライブラリーを鋳型として、E P H A 2のc D N Aを特異的に増幅するプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応（以下「P C R」という）（S a i k i , R . K . , e t a l . , S c i e n c e , (1 9 8 8) 2 3 9 , 4 8 7 - 4 9）を行なう、いわゆるP C R法により取得すること

ができる。

[0042] なお、ヒトE P H A 2をコードするヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、E P H A 2と同等の生物活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドもE P H A 2のc D N Aに含まれる。さらに、ヒトE P H A 2遺伝子座から転写されるスプライシングバリエーションまたはこれにストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、かつ、E P H A 2と同等の生物活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドもE P H A 2のc D N Aに含まれる。

[0043] また、ヒトE P H A 2のアミノ酸配列、またはこれらの配列からシグナル配列が除かれたアミノ酸配列において、1個、2もしくは3個または4もしくは5個のアミノ酸が置換、欠失、または付加されたアミノ酸配列からなり、E P H A 2と同等の生物活性を有する蛋白質もE P H A 2に含まれる。さらに、ヒトE P H A 2遺伝子座から転写されるスプライシングバリエーションにコードされるアミノ酸配列または該アミノ酸配列において、1個、2もしくは3個または4もしくは5個のアミノ酸が置換、欠失、または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、E P H A 2と同等の生物活性を有する蛋白質もE P H A 2に含まれる。

[0044] 本明細書で使用された、シグナルペプチドを含まない成熟型ヒトE P H A 2をコードするヌクレオチド配列は配列表の配列番号1に記載されており、該ヒトE P H A 2のアミノ酸配列は配列表の配列番号2に記載されている。

2. 抗E P H A 2抗体の製造

本発明のE P H A 2に対する抗体は、常法を用いて、E P H A 2またはE P H A 2のアミノ酸配列から選択される任意のポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。抗原となるE P H A 2の生物種はヒトに限定されず、マウス、ラット等のヒト以外の動物に由来するE P H A 2を動物に免疫することもできる。この場合には、取得された異種E P H A 2に結合する抗体とヒトE P H A 2との

交差性を試験することによって、ヒトの疾患に適用可能な抗体を選別できる。なお、抗原となるE P H A 2はE P H A 2 遺伝子を遺伝子操作により宿主細胞に産生させることによって得ることができる。具体的には、E P H A 2 遺伝子を発現可能なベクターを作製し、これを宿主細胞に導入して該遺伝子を発現させ、発現したE P H A 2 を精製すればよい。

[0045] 本発明のE P H A 2 に対する抗体は、DNA免疫法を使用して得ることもできる。DNA免疫法とは、抗原発現プラスミドをマウスやラットなどの動物個体に遺伝子導入し、抗原を個体内で発現させることによって、抗原に対する免疫を誘導する手法である。遺伝子導入の手法には、直接プラスミドを筋肉に注射する方法や、リポソームやポリエチレンジオキサンなどの導入試薬を静脈注射する方法、ウイルスベクターを用いる手法、プラスミドを付着させた金粒子をGene Gunにより打ち込む手法、急速に大量のプラスミド溶液を静脈注射するHydrodynamic法などが存在する。発現プラスミドの筋注による遺伝子導入法に関して、発現量を向上させる手法として、プラスミドを筋注後、同部位にエレクトロポレーションを加える*in vivo electroporation*という技術が知られている(Aihara H, Miyazaki J. Nat Biotechnol. 1998 Sep; 16 (9) : 867-70またはMir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Delaere P, Branellec D, Schwartz B, Scherman D. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Apr 13; 96 (8) : 4262-7.)。本手法はプラスミドの筋注前にヒアルロニダーゼで筋肉を処理することにより、さらに発現量が向上する(McMahon JM1, Signori E, Wells KE, Fazio VM, Wells DJ. Gene Ther. 2001 Aug; 8 (16) : 1264-70)。

[0046] また、公知の方法（例えば、Kohler and Milstein,

Nature (1975) 256, p. 495-497, Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, p. 365-367, Plenum Press, N. Y. (1980)) に従って、E P H A 2 に対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることによりハイブリドーマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることもできる。このような方法の具体的な例は、国際公開第WO09/48072号パンフレット(2009年4月16日公開)および第WO10/117011号(2010年10月14日公開)パンフレットに記載されている。

[0047] このようにして樹立されたマウス抗ヒトE P H A 2 抗体の実例としては、A 2 0 1 抗体およびA 2 0 5 抗体を挙げることができる。A 2 0 1 抗体重鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号51に、これをコードするヌクレオチド配列は配列表の配列番号50に、それぞれ示されている。A 2 0 1 抗体軽鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号54に、これをコードするヌクレオチド配列は配列表の配列番号53に、それぞれ示されている。また、A 2 0 5 抗体重鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号57に、これをコードするヌクレオチド配列は配列表の配列番号56に、それぞれ示されている。A 2 0 5 抗体軽鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号59に、これをコードするヌクレオチド配列は配列表の配列番号58に、それぞれ示されている。

[0048] 本発明の抗体は、A 2 0 1 に由来する6種全てのC D R 配列を保持し、E P H A 2 に結合する活性を有している抗体であってよい。すなわち、本発明の抗体の重鎖可変領域は、配列番号60に示されるアミノ酸配列からなるC D R H 1 (D T Y V H)、配列番号61に示されるアミノ酸配列からなるC D R H 2 (R I D P A N A N T K Y D P K F Q G)、および配列番号62に示されるアミノ酸配列からなるC D R H 3 (Y G K S A W F A Y) を保有している。また、前記の抗体の軽鎖可変領域は、配列番号63に示されるアミノ酸配列からなるC D R L 1 (R A S Q D I G N Y L N)、配列番号64に示されるアミノ酸配列からなるC D R L 2 (Y T S R L H S)、および配列番号65に示されるアミノ酸配列からなるC D R L 3 (Q Q G H S L P P T

）を保有している。これらのCDRのアミノ酸配列は、図11にも記載されている。

[0049] 本発明の抗体は、A205に由来する6種全てのCDR配列を保持し、E P H A 2に結合する活性を有している抗体であってよい。すなわち、本発明の抗体の重鎖可変領域は、配列番号66に示されるアミノ酸配列からなるCDRH1(DY SMN)、配列番号67に示されるアミノ酸配列からなるCDRH2(W I N T Y T G E P T Y A D D F K G)、および配列番号68に示されるアミノ酸配列からなるCDRH3(P I S L L R L L D Y)を保有している。また、前記の抗体の軽鎖可変領域は、配列番号69に示されるアミノ酸配列からなるCDRL1(R S S Q S L V H S N G N T Y L H)、配列番号70に示されるアミノ酸配列からなるCDRL2(K V S N R F S)、および配列番号71に示されるアミノ酸配列からなるCDRL3(S Q S T H V P W T)を保有している。これらのCDRのアミノ酸配列は、図12にも記載されている。

本発明の抗体はE P H A 2蛋白質を特異的に認識する。言い換えれば、本発明の好適な抗体はE P H A 2蛋白質に特異的に結合する。

ある態様において、好適な抗体は、非変性型のヒトE P H A 2、及び、ホルマリンで固定した標本中の変性型ヒトE P H A 2の両方に特異的に結合する。また、より好適な抗体は、非変性型のヒトE P H A 2、及び、ホルマリンで固定した標本中の変性型ヒトE P H A 2の両方に特異的に結合し、かつ他のE p hファミリーに特異的に結合しない抗体等を挙げることができるが、それらに限定されるものではない。

[0050] 本発明の抗体には、上記のE P H A 2に対するモノクローナル抗体に加え、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ(Chimeric)抗体、またはヒト化(Humanized)抗体も含まれる。これらの抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

[0051] キメラ抗体としては、抗体の可変領域と定常領域が互いに異種である抗体

、例えばマウスまたはラット由来抗体の可変領域をヒト由来の定常領域に接合したキメラ抗体を挙げることができる（Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, 6851-6855, (1984) 参照）。

[0052] 上記のE P H A 2に対するキメラ抗体の配列を、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変して、遺伝子組換え型抗体であるヒト化（Humanized）抗体を作製することができる。本発明の抗体には、前記ヒト化抗体のCDRを改変した抗体が含まれる。これらの抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

[0053] ヒト化抗体としては、相補性決定領域（CDR；complementarity determining region）のみをヒト由来の抗体に組み込んだ抗体（Nature（1986）321, p. 522-525 参照）、CDRの配列に加え一部のフレームワークのアミノ酸残基もヒト抗体に移植した抗体（国際公開第WO90/07861号パンフレット）を挙げることができる。

[0054] なお、哺乳類培養細胞で生産される抗体の重鎖のカルボキシル末端のリシン残基が欠失することが知られており（Journal of Chromatography A, 705:129-134（1995））、また、同じく重鎖カルボキシル末端のグリシン、リシンの2アミノ酸残基が欠失し、新たにカルボキシル末端に位置するプロリン残基がアミド化されることが知られている（Analytical Biochemistry, 360:75-83（2007））。しかし、これらの重鎖配列の欠失および修飾は、抗体の抗原結合能およびエフェクター機能（補体の活性化や抗体依存性細胞傷害作用など）には影響を及ぼさない。従って、本発明には当該修飾を受けた抗体も含まれ、重鎖カルボキシル末端において1または2つのアミノ酸が欠失した欠失体、およびアミド化された当該欠失体（例えば、カルボキシル末端部位のプロリン残基がアミド化された重鎖）等を挙げることができる。但し、抗原結合能およびエフェクター機能が保たれている限り、本発明に係る抗体の重鎖のカルボキシル末端の欠失体は上記の種類に限定されない

。本発明に係る抗体を構成する2本の重鎖は、完全長および上記の欠失体からなる群から選択される重鎖のいずれか一種であっても良いし、いずれか二種を組み合わせたものであっても良い。各欠失体の量比は本発明に係る抗体を産生する哺乳類培養細胞の種類および培養条件に影響を受け得るが、本発明に係る抗体の主成分としては2本の重鎖の双方でカルボキシル末端の1つのアミノ酸残基が欠失している場合を挙げることができる。

[0055] 以上の方法によって得られた抗体は、抗原に対する結合性を評価し、好適な抗体を選抜することができる。抗体の性質を比較する際の別の指標の一例としては、抗体の安定性を挙げることができる。示差走査カロリメトリー（DSC）は、蛋白の相対的構造安定性の良い指標となる熱変性中点（ T_m ）を素早く、また正確に測定することができる方法である。DSCを用いて T_m 値を測定し、その値を比較することによって、熱安定性の違いを比較することができる。抗体の保存安定性は、抗体の熱安定性とある程度の相関を示すことが知られており（Lori Burton, et. al., *Pharmaceutical Development and Technology*（2007）12, p. 265–273）、熱安定性を指標に、好適な抗体を選抜することができる。抗体を選抜するための他の指標としては、適切な宿主細胞における収量が高いこと、および水溶液中での凝集性が低いことを挙げることができる。例えば収量の最も高い抗体が最も高い熱安定性を示すとは限らないので、以上に述べた指標に基づいて総合的に判断して、最も適した抗体を選抜する必要がある。

[0056] また、抗体の重鎖および軽鎖の全長配列を適切なリンカーを用いて連結し、一本鎖イムノグロブリン（single chain immunoglobulin）を取得する方法も知られている（Lee, H-S, et. al., *Molecular Immunology*（1999）36, p. 61–71; Shirrmann, T. et. al., *mAbs*（2010）, 2,（1）p. 1–4）。このような一本鎖イムノグロブリンは二量体化することによって、本来は四量体である抗体と類似した構造と活性を保持

することが可能である。また、本発明の抗体は、単一の重鎖可変領域を有し、軽鎖配列を有さない抗体であっても良い。このような抗体は、単一ドメイン抗体 (single domain antibody: sdAb) またはナノボディ (nanobody) と呼ばれており、実際にラクダまたはラマで観察され、抗原結合能が保持されていることが報告されている (Muyldemans S. et. al., Protein Eng. (1994) 7 (9), 1129-35, Hamers-Casterman C. et. al., Nature (1993) 363 (6428) 446-8)。上記の抗体は、本発明における抗体の抗原結合性断片の一種と解釈することも可能である。

[0057] 抗体遺伝子を一旦単離した後、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。抗体遺伝子の具体例としては、本明細書に記載された抗体の重鎖配列をコードする遺伝子、および軽鎖配列をコードする遺伝子を組み合わせたものを挙げることができる。宿主細胞を形質転換する際には、重鎖配列遺伝子と軽鎖配列遺伝子は、同一の発現ベクターに挿入されていることが可能であり、又別々の発現ベクターに挿入されていることも可能である。真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真核微生物を用いることができる。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、サルの細胞であるCOS細胞 (Gluzman, Y. Cell (1981) 23, p. 175-182、ATCC CRL-1650)、マウス線維芽細胞NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658) やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO細胞、ATCC CCL-61) のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株 (Urlaub, G. and Chasin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1980) 77, p. 4126-4220) を挙げることができる。また、原核細胞を使用する場合は、例えば、大腸菌、枯草菌を挙げることができる。これらの細胞に目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養すること

により抗体が得られる。以上の培養法においては抗体の配列によって収量が異なる場合があり、同等な結合活性を持つ抗体の中から収量を指標に医薬としての生産が容易なものを選別することが可能である。

[0058] 本発明の抗体のアイソタイプとしての制限はなく、例えば I g G (I g G 1, I g G 2, I g G 3, I g G 4)、I g M、I g A (I g A 1, I g A 2)、I g DあるいはI g E等を挙げることができるが、好ましくはI g GまたはI g M、さらに好ましくはI g G 1またはI g G 2を挙げることができる。

[0059] また本発明の抗体は、抗体の抗原結合部を有する抗体の抗原結合性断片またはその修飾物であってもよい。抗体をパパイン、ペプシン等の蛋白質分解酵素で処理するか、あるいは抗体遺伝子を遺伝子工学的手法によって改変し適当な培養細胞において発現させることによって、該抗体の断片を得ることができる。このような抗体断片のうちで、抗体全長分子の持つ機能の全てまたは一部を保持している断片を抗体の抗原結合性断片と呼ぶことができる。抗体の機能としては、一般的には抗原結合活性、抗原の活性を中和する活性、抗原の活性を増強する活性、抗体依存性細胞傷害活性、補体依存性細胞傷害活性および補体依存性細胞性細胞傷害活性を挙げることができる。本発明における抗体の抗原結合性断片が保持する機能は、E P H A 2に対する結合活性である。

[0060] 例えば、抗体の断片としては、F a b、F (a b') 2、F v、または重鎖および軽鎖のF vを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンF v (s c F v)、d i a b o d y (d i a b o d i e s)、線状抗体、および抗体断片より形成された多特異性抗体などを挙げることができる。また、F (a b') 2を還元条件下で処理した抗体の可変領域の一価の断片であるF a b' も抗体の断片に含まれる。

[0061] さらに、本発明の抗体は少なくとも2種類の異なる抗原に対して特異性を有する多特異性抗体であってもよい。通常このような分子は2種類の抗原に結合するものであるが(即ち、二重特異性抗体(b i s p e c i f i c a

nt i b o d y))、本発明における「多特異性抗体」は、それ以上（例えば、3種類）の抗原に対して特異性を有する抗体を包含するものである。

[0062] 本発明の多特異性抗体は、全長からなる抗体、またはそのような抗体の断片（例えば、F（a b'）₂二重特異性抗体）でもよい。二重特異性抗体は2種類の抗体の重鎖と軽鎖（HL対）を結合させて作製することもできるし、異なるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを融合させて、二重特異性抗体産生融合細胞を作製することによっても、作製することができる（M i l l s t e i n e t a l . , N a t u r e (1 9 8 3) 3 0 5 , p . 5 3 7 - 5 3 9）。

[0063] 本発明の抗体は一本鎖抗体（s c F vとも記載する）でもよい。一本鎖抗体は、抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域とをポリペプチドのリンカーで連結することにより得られる（P l u c k t h u n , T h e P h a r m a c o l o g y o f M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s , 1 1 3（R o s e n b e r g および M o o r e 編、S p r i n g e r V e r l a g , N e w Y o r k , p . 2 6 9 - 3 1 5（1994）、N a t u r e B i o t e c h n o l o g y（2005）、23, p . 1 1 2 6 - 1 1 3 6）。また、2つのs c F vをポリペプチドリinkerで結合させて作製されるB i s c F v断片を二重特異性抗体として使用することもできる。

[0064] 一本鎖抗体を作製する方法は当技術分野において周知である（例えば、米国特許第4, 946, 778号、米国特許第5, 260, 203号、米国特許第5, 091, 513号、米国特許第5, 455, 030号等を参照）。このs c F vにおいて、重鎖可変領域と軽鎖可変領域は、コンジュゲートを作らないようなリンカー、好ましくはポリペプチドリinkerを介して連結される（H u s t o n , J . S . e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A .（1988）、85, p . 5 8 7 9 - 5 8 8 3）。s c F vにおける重鎖可変領域および軽鎖可変領域は、同一の抗体に由来してもよく、別々の抗体に由来してもよい。可変領域を連結するポリペプチドリinkerとしては、例えば12～19残基からなる任意の一本鎖ペプチド

が用いられる。

[0065] s c F v をコードする D N A は、前記抗体の重鎖または重鎖可変領域をコードする D N A、および軽鎖または軽鎖可変領域をコードする D N A のうち、それらの配列のうちの全部または所望のアミノ酸配列をコードする D N A 部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いて P C R 法により増幅し、次いで、さらにポリペプチドリンカー部分をコードする D N A、およびその両端が各々重鎖、軽鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

[0066] また、一旦 s c F v をコードする D N A が作製されると、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いることにより、常法に従って s c F v を得ることができる。これらの抗体断片は、前記と同様にして遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。

[0067] 本発明の抗体は、多量化して抗原に対する親和性を高めたものであってもよい。多量化する抗体としては、1種類の抗体であっても、同一の抗原の複数のエピトープを認識する複数の抗体であってもよい。抗体を多量化する方法としては、I g G C H 3 ドメインと2つの s c F v との結合、ストレプトアビジンとの結合、ヘリックスターナーヘリックスモチーフの導入等を挙げることができる。

[0068] 本発明の抗体は、アミノ酸配列が異なる複数種類の抗 E P H A 2 抗体の混合物である、ポリクローナル抗体であってもよい。ポリクローナル抗体の一例としては、C D R が異なる複数種類の抗体の混合物を挙げることができる。そのようなポリクローナル抗体としては、異なる抗体を産生する細胞の混合物を培養し、該培養物から精製された抗体を用いることが出来る（W O 2 0 0 4 / 0 6 1 1 0 4 号参照）。

[0069] 抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール（P E G）等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。

[0070] 本発明の抗体は、更にこれらの抗体と他の薬剤がコンジュゲートを形成し

ているもの (Immunoc conjugate) でもよい。このような抗体の例としては、該抗体が放射性物質や薬理作用を有する化合物と結合している物を挙げることができる (Nature Biotechnology (2005) 23, p. 1137-1146)。

[0071] 得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えばカラムクロマトグラフィー、フィルター濾過、限外濾過、塩析、透析、調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)) が、これらに限定されるものではない。

[0072] クロマトグラフィーとしては、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等を挙げることができる。これらのクロマトグラフィーは、HPLCやFPLC等の液体クロマトグラフィーを用いて行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムを挙げることができる。例えばプロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (ファルマシア) 等を挙げることができる。また、抗原を固定化した担体を用いて、抗原への結合性を利用して抗体を精製することも可能である。

[0073] 3. 医薬組成物

本発明は抗E P H A 2抗体もしくはその機能断片またはその修飾体を含む医薬組成物を提供する。

[0074] 本発明の医薬組成物はE P H A 2もしくはそのリガンドの過剰発現またはE P H A 2の変異もしくは遺伝子増幅によるE P H A 2シグナル異常または亢進、または、E P H A 2のアイソフォームのスイッチングにより惹起されるかまたは増悪化される各種疾患（以下、「E P H A 2に関わる疾患」という）、とりわけ各種癌の治療または予防に有用である。

[0075] かかる治療または予防の対象となる癌の惹起または増悪化の原因としては、E P H A 2遺伝子のイントロン内の一塩基置換（S N P）、E P H A 2の高発現、E P H A 2を恒常的に活性化するミスセンス変異、E P H A 2遺伝子の増幅または過剰発現、E P H A 2アイソフォームのスイッチング等を例示することができる。

[0076] かかる癌種としては、例えば、乳癌、子宮内膜癌、卵巣癌、非小細胞肺癌などの肺癌、胃癌、前立腺癌、腎癌、肝臓癌、膵臓癌、大腸癌、食道癌、膀胱癌、子宮頸癌、血液癌、リンパ腫、悪性黒色腫等をあげることができ、好適にはE P H A 2蛋白質を発現しているそれらの癌をあげることができる。

[0077] 本発明において、疾患の治療または予防には、かかる疾患、好適にはE P H A 2蛋白質を発現している個体におけるかかる疾患の発症の予防、増悪化または進行の抑制または阻害、かかる疾患に罹患した個体が呈する一つまたは二つ以上の症状の軽減、増悪化もしくは進行の抑制または寛解、二次性疾患の治療または予防等が含まれるが、それらに限定されるものではない。

[0078] 本発明の医薬組成物には、治療または予防に有効な量の抗E P H A 2抗体または該抗体の機能断片と薬学上許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存剤および／または補助剤を含有せしめることができる。

[0079] 「治療または予防に有効な量」とは、特定の疾患、投与形態および投与経路につき治療または予防効果を奏する量を意味し、「薬理学的に有効な量」と同義である。

[0080] 本発明の医薬組成物には、p H、浸透圧、粘度、透明度、色、等張性、無

菌性、該組成物またはそれに含まれる抗体の安定性、溶解性、徐放性、吸収性、浸透性、剤型、強度、性状、形状等を変化させたり、維持したり、保持したりするための物質（以下、「製剤用の物質」という）を含有せしめることができる。製剤用の物質としては、薬理学的に許容される物質であれば特に限定されるものではない。例えば、非毒性または低毒性であることは、製剤用の物質が好適に具備する性質である。

[0081] 製剤用の物質として、例えば、アミノ酸類、抗菌剤、抗酸化剤、緩衝剤、充填剤、キレート剤、錯化剤、増量剤、単糖類、二糖類、炭水化物、着色剤、香味剤、希釈剤、乳化剤、親水ポリマー、の防腐剤、溶媒、糖アルコール、懸濁剤、界面活性剤、安定化増強剤、弾性増強剤、輸送剤、希釈剤、賦形剤、および／または薬学上の補助剤等を挙げることができ、それらの物質の添加量は、抗E P H A 2抗体もしくはその機能断片またはその修飾体の重量に対して0.001乃至1000倍、好適には0.01乃至100倍、より好適には0.1乃至10倍である。

[0082] 抗E P H A 2抗体もしくはその機能断片またはその修飾体をリポソーム中に含有せしめたイムノリポソーム、抗体とリポソームとが結合してなる抗体修飾体（米国特許第6214388号等）を含有する医薬組成物も、本発明の医薬組成物に含まれる。

[0083] 賦形剤や担体は、通常液体または固体であり、注射用の水、生理食塩水、人工脳脊髄液、その他の、経口投与または非経口投与用の製剤に用いられる物質であれば特に限定されない。生理食塩水としては、中性のもの、血清アルブミンを含むもの等をあげることができる。

[0084] 緩衝剤としては、医薬組成物の最終pHが7.0乃至8.5になるように調製されたT r i sバッファー、同じく4.0乃至5.5になるように調製された酢酸バッファー、同じく5.0乃至8.0になるように調製されたクエン酸バッファー、同じく5.0乃至8.0になるように調製されたヒスチジンバッファー等を例示することができる。

[0085] 本発明の医薬組成物は、固体、液体、懸濁液等である。凍結乾燥製剤をあ

げることができる。凍結乾燥製剤を成型するには、スクロース等の賦形剤を用いることができる。

[0086] 本発明の医薬組成物の投与径路としては、経腸投与、局所投与および非経口投与のいずれでもよく、例えば、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、皮内投与、皮下投与、腹腔内投与、経皮投与、骨内投与、関節内投与等をあげることができる。

[0087] かかる医薬組成物の組成は、投与方法、抗体のE P H A 2蛋白質結合親和性等に応じて決定することができる。本発明の抗E P H A 2抗体もしくはその機能断片またはその修飾体のE P H A 2蛋白質に対する親和性が高いほど（K D値が低いほど）、少ない投与量でその薬効を発揮し得る。

[0088] 本発明の抗E P H A 2抗体の投与量は、薬理学的に有効な量であれば限定されず、個体の種、疾患の種類、症状、性別、年齢、持病、該抗体のE P H A 2蛋白質結合親和性またはその生物活性、その他の要素に応じて適宜決定することができるが、通常、0.01乃至1000mg/kg、好適には0.1乃至100mg/kgを、1乃至180日間に1回、または1日2回もしくは3回以上投与することができる。

[0089] 医薬組成物の形態としては、注射剤（凍結乾燥製剤、点滴剤を含む）、坐剤、経鼻型吸収製剤、経皮型吸収製剤、舌下剤、カプセル、錠剤、軟膏剤、顆粒剤、エアゾル剤、丸剤、散剤、懸濁剤、乳剤、点眼剤、生体埋め込み型製剤等を例示することができる。

[0090] 抗E P H A 2抗体もしくはその機能断片またはその修飾体を有効成分として含む医薬組成物は他の医薬と同時にあるいは個々に投与することができる。例えば、他の医薬を投与した後に抗E P H A 2抗体または該抗体の機能断片を有効成分として含む医薬組成物を投与するか、かかる医薬組成物を投与した後に、他の医薬を投与するか、または、当該医薬組成物と他の医薬とを同時に投与してもよい。他の医薬としては、化学療法剤、放射線療法など各種抗癌剤等をあげることができる。それらをまとめて本発明の抗体と「他の薬剤との併用」と呼び、本発明の抗体、その機能断片またはその修飾体に加

えてさらなる薬剤を含む医薬組成物も本発明に含まれる。

[0091] 本発明は癌などE P H A 2に関わる疾患の治療方法または予防方法、該疾患の治療用または予防用医薬組成物を調製するための本発明の抗体の使用、該疾患の治療または予防のための本発明の抗体の使用、をも提供する。本発明の抗体を含む治療用または予防用キットも本発明に含まれる。

[0092] 4. 診断用組成物

本発明の抗E P H A 2抗体もしくはその機能断片またはその修飾体を含む検査用または診断用組成物（以下、まとめて「診断用組成物」という）を提供する。

[0093] 本発明の診断用組成物は、癌などE P H A 2に関わる疾患、E P H A 2発現の検査または診断に有用である。本発明において検査または診断には、例えば、罹患リスクの判定または測定、罹患の有無の判定、進行や増悪化の程度の測定、抗E P H A 2抗体等の医薬組成物による薬物治療の効果の測定または判定、薬物治療以外の治療の効果の測定または判定、再発リスクの測定、再発の有無の判定等が含まれるが、検査または診断であればそれらに限定されるものではない。

[0094] 本発明の診断用組成物は、本発明の抗体もしくはその機能断片またはその修飾体、それらを含む組成物、それらを含む医薬組成物を投与する個体の同定に有用である。

[0095] かかる診断用組成物には、p H緩衝剤、浸透圧調節剤、塩類、安定化剤、防腐剤、顕色剤、増感剤、凝集防止剤等を含有せしめることができる。

[0096] 本発明は癌などE P H A 2に関わる疾患の検査方法または診断方法、該疾患の診断用組成物を調製するための本発明の抗体の使用、該疾患の検査または診断のための本発明の抗体の使用、をも提供する。本発明の抗体を含む検査または診断用キットも本発明に含まれる。

[0097] 本発明の抗体を含む検査または診断の方法としてはサンドウィッチE L I S Aが望ましいが、通常のE L I S A法やR I A法、E L I S P O T（E n z y m e - L i n k e d I m m u n o S p o t）法、ドットブロット法、

オクタロニー法、CIE (Counterimmunoelectrophoresis) 法、CLIA (Chemiluminescent immunoassay)、FCM (Flow Cytometry) などの抗体を利用した検出方法が利用可能である。抗体の標識法としてはビオチンのほか、HRP、アルカリフォスファターゼ、FITCやALEXAなどの蛍光団、放射性同位元素などのラベルなど生化学的解析に実施可能な標識法が利用できる。酵素標識を利用した検出にはTMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine)、BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)、*p*-NPP (*p*-nitrophenyl phosphate)、OPD (o-Phenylenediamine)、ABTS (3-Ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)、Super Signal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) などの発色基質やQuantaBlu™ Fluorogenic Peroxidase Substrate (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) 蛍光基質のほか、化学発光基質を用いることができる。本測定には、ヒトまたは非ヒト動物由来の試料に加え、組換え蛋白質等の人工的な処理を加えた試料をも供することができる。生物個体由来の被検試料としては、例えば、血液、関節液、腹水、リンパ液、脳脊髄液、組織ホモジネート上清、組織切片等をあげることができるが、それらに限定されるものではない。

[0098] 本発明の抗体を含む検査または診断用のサンドウィッチELISAキットには、EPHA2蛋白質標準液、発色試薬、希釈用緩衝液、固相用抗体、検出用抗体、ならびに洗浄液等が含まれてよい。抗原に結合した抗体量を測定する方法としては、吸光法、蛍光法、発光法、RI (Radioisotope) 法等が好適に適用され、測定には、吸光プレートリーダー、蛍光プレートリーダー、発光プレートリーダー、RI液体シンチレーションカウンタ等が好適に使用される。

[0099] 前記の免疫組織学的試験だけでなく、試料中の細胞、組織または臓器もしくはその一部から、常法に従って可溶性蛋白を調製し、当該可溶性蛋白に標識化抗体を反応させることにより可溶性蛋白中のE P H A 2の存否を確認するウェスタンブロッティング法やドットブロット法においても用いることができる。

[0100] 本発明は免疫組織化学（immunohistochemistry：IHC）の分析に有用な抗体、その機能断片およびその修飾体、ならびにそれらを含む組成物を提供する。かかる組成物も本発明の「診断用組成物」に含まれる。

[0101] 免疫組織化学は、組織切片を抗原に結合する抗体（一次抗体）を反応させ、抗原に結合した一次抗体を検出する手法であれば特に限定されない。組織切片は、好適にはホルマリン固定後にパラフィン包埋処理する。パラフィン包埋後、薄切した組織切片を脱パラフィン処理した後、抗原賦活処理および非特異的反応抑制処理を行う。抗原賦活処理の方法としては、加熱処理、プロテアーゼ等による酵素処理を例示することができ、好適には加熱処理である。加熱処理の条件としては、通常、温度90乃至110℃、pH8乃至10、処理時間20乃至60分の範囲が好適である。pHの調整にはTris-EDTA緩衝液（例えば、1mMのEDTAを含有する10mMトリス緩衝液）等を使用することができる。非特異的反応抑制処理としては、発色に使用する酵素と同様または類似の触媒活性を有する内因性の酵素を不活性化する方法が通常用いられる。ペルオキシダーゼ反応により発色させる場合、予め組織中に存在する内因性のペルオキシダーゼをH₂O₂等で阻害することが好ましい。H₂O₂の溶媒は水、メタノール等を使用することができ、H₂O₂の濃度は0.1乃至3%、好適には0.3乃至3%である。H₂O₂溶液にはアジ化ナトリウムを添加することができる。また、血清やカゼインによりブロッキングする方法も非特異的反応抑制処理として使用することができる。血清やカゼインは、一次抗体反応の前に組織を処理することができるが、1次抗体を希釈する溶媒に含有せしめることもできる。

一次抗体の反応条件は特に限定されないが、温度4乃至50℃、好適には20乃至37℃、より好適には24℃である。反応時間は5分乃至一昼夜、好適には10分乃至4時間、より好適には30分乃至1時間である。

[0102] 一次抗体の検出には、好適には、可視化することができ且つ一次抗体に結合する抗体（二次抗体）を用いることができる。二次抗体自体に結合する抗体（三次抗体）を用いて3回以上の反応を行う場合もある。二次抗体または三次抗体の可視化法としては、ペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼ等の酵素をそれらの抗体に結合させるか、またはそれらの抗体にビオチン等を付加して前記酵素を結合させたストレプトアビジン等と結合させ、それらの酵素に対応する発色基質を反応させる方法を好適に使用することができる。酵素を二次抗体または三次抗体に結合させる方法としては、デキストリンポリマーやアミノ酸ポリマーに前記酵素と二次抗体を多数結合させた試薬を用いる方法（ポリマー法）を例示することができる。ビオチン化二次抗体およびペルオキシダーゼ標識したストレプトアビジンを反応させる方法（LSAB法）では、発色基質としてDAB等を用いることができる。また、蛍光色素などで標識された二次抗体を使用することもできる。蛍光標識二次抗体で処理した場合、処理後に蛍光顕微鏡を用いて陽性細胞を検出する。

[0103] スメア法では、摘出細胞をガラスに塗布または遠心分離機で分離し、細胞成分と液性成分に分け、細胞成分について免疫染色を行う。すなわち、細胞成分をスライドガラス上に塗布し、エタノール液または10%ホルマリン液などで固定した後、組織切片と同様の免疫染色を行うことができる。

[0104] 凍結包埋法では、摘出組織をOC Tコンパウンド等での包埋後に液体窒素等で急速凍結し、クリオスタットで薄切することでスライド標本を作製する。この標本を10%ホルマリンやエタノール液などで固定した後、組織切片と同様の免疫染色を行うことができる。

[0105] 免疫組織化学に係る操作は、反応液、反応条件、洗浄回数等をプログラムして免疫装置に組み込み、自動化して行なうことができる。

[0106] 画像診断の場合は、薬学的に許容可能な放射性核種や発光体を抗体にラベ

ル氏、被験者に該抗体を投与し、PET/CTなどの画像診断技術を使用して画像を取り、E P H A 2の存在を判定または検査することができる。

[0107] 本発明の診断用組成物に含まれる抗体、その機能断片またはその修飾体は、好適にはE P H A 2に結合又は認識する抗体、すなわちE P H A 2選択性を有する抗体、その機能断片またはその修飾体である。

[0108] ヒトE P H A 2選択性を有する抗体としては、マウスA 2 0 1抗体の重鎖のCDRH1乃至CDRH3（配列番号60乃至62に示されるアミノ酸配列（図11））を含む重鎖、ならびに、軽鎖のCDRL1乃至CDRL3（配列番号63乃至65に示されるアミノ酸配列（図11））を含む軽鎖、を含む抗体、マウスA 2 0 1抗体の重鎖可変領域（配列番号51のアミノ酸番号20乃至137に示されるアミノ酸配列）および軽鎖可変領域（配列番号54のアミノ酸番号20乃至128番目に示されるアミノ酸配列）を含む抗体、マウスA 2 0 1抗体の重鎖および軽鎖を含む抗体等を例示することができる。かかる抗体としては、マウスA 2 0 1抗体、キメラA 2 0 1抗体等をあげることができるが、それらに限定されるものではない。

[0109] ヒトE P H A 2選択性を有する抗体としては、マウスA 2 0 5抗体の重鎖のCDRH1乃至CDRH3（配列番号66乃至68に示されるアミノ酸配列（図12））を含む重鎖、ならびに、軽鎖のCDRL1乃至CDRL3（配列番号69乃至71に示されるアミノ酸配列（図12））を含む軽鎖、を含む抗体、マウスA 2 0 5抗体の重鎖可変領域（配列番号57のアミノ酸番号20乃至138番に示されるアミノ酸配列）および軽鎖可変領域（配列番号59のアミノ酸番号20乃至133番に示されるアミノ酸配列）を含む抗体、マウスA 2 0 5抗体の重鎖および軽鎖を含む抗体等を例示することができる。かかる抗体としては、マウスA 2 0 5抗体、キメラA 2 0 5抗体等をあげることができるが、それらに限定されるものではない。

[0110] 本発明の一つの好適な態様において、診断用組成物は、E P H A 2検出用または測定用である。

[0111] 本発明は被検サンプル中のヒトE P H A 2を検出または測定する方法を提

供する。

[0112] これらの検出または測定方法には、本発明の診断用組成物を使用することができる。かかる測定方法および診断用組成物は、ヒトE P H A 2陽性癌の診断用または検査用としても本発明に含まれる。

[0113] 本発明の医薬組成物が投与される個体を同定する方法も本発明に含まれる。かかる同定方法においては、該個体由来サンプル中のヒトE P H A 2を測定し、該サンプル中に、ヒトE P H A 2が検出されたか、または、健常個体由来サンプル中に検出されたヒトE P H A 2の量と比較してより多くのヒトE P H A 2が検出された場合に、該個体を陽性と判定することができる。

[0114] 当該方法には、本発明の診断用組成物を使用することができる。

[0115] また、かかる同定方法の好適な一態様において、該個体は癌に罹患しているかまたはそのリスクがある。

[0116] さらに、本発明の医薬組成物は、その一態様において、かかる同定方法において陽性と判定された個体に投与され得る。

[0117] 5. 試薬

本発明の抗体もしくはその機能断片またはその修飾体は、試薬としても有用である。かかる試薬は、上述の検査または診断用、研究用およびその他の用途で使用される。

実施例

[0118] 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、下記実施例において遺伝子操作に関する各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング (M o l e c u l a r C l o n i n g)」(S a m b r o o k, J. , F r i t s c h, E. F. , およびM a n i a t i s, T. 著, C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s sより1989年に発刊)に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

[0119] (実施例1) マウス抗ヒトE P H A 2抗体の作製

1) - 1 免疫

免疫にはFcgr2b KO (BALB/c) Homoマウスの雌(免疫生物研究所社)を使用した。Recombinant Human EPHA2 (R&D SYSTEM社; 3035-A2) と Freund's Complete Adjuvant (和光純薬社) を混合したものを皮下に投与したマウスの脾臓を採取しハイブリドーマ作製に用いた。

[0120] 1) - 2 ハイブリドーマ作製

脾臓細胞とマウスミエローマSP2/O-Ag14細胞(ATCC:CRL-1581)とをPEG4000(免疫生物研究所社)またはHybridoma Hybrid Production System (Cyto Pulse Sciences社)を用いて細胞融合し、ClonaCell-HY Selection Medium D (StemCell Technologies社)に希釈して培養した。出現したハイブリドーマコロニーを回収することでモノクローナルハイブリドーマを作製した。回収された各ハイブリドーマコロニーを培養し、得られたハイブリドーマ培養上清を用いて抗EPHA2抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングを行った。

[0121] (実施例2) マウス抗ヒトEPHA2抗体の抗原結合能の評価

2) - 1 ヒトEPHA2及びヒトEPHA2に配列類似性のあるタンパク質を発現するベクターの構築

2) - 1 - 1 発現ベクターの構築

pFLAG-myc-CMV19 (Sigma社)の平滑末端化されたHindIIIとBglIIサイトにGateway Vector Conversion System (Life Technologies社、Thermo Fisher Scientific社)のReading Frame Bを結合した。このベクターを「pFLAG-GW」と名付けた。

[0122] 2) - 1 - 2 EPHA2を発現するベクターの構築

シグナル配列のないヒトEPHA2をコードするDNA断片(配列番号1

) をプライマーセット

5' -GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCA
GCGCAGGGCAAGGAAG-3' (EPHA2-Fw : 配列番号3
)

5' -GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT
CAGATGGGGATCCCCAC-3' (EPHA2-Re : 配列番号
4)

を使用しPCRで増幅した。このPCR断片をBP組換え反応によりエントリーベクターpDONR221 (Life Technologies社、Thermo Fisher Scientific社) にトランスファーした。そして、このエントリーベクターからLR組換え反応によってEPHA2をコードする遺伝子をpFLAG-GWにトランスファーした。この結果できたベクターをpFLAG-EPHA2と名づけた。なお、配列番号1のアミノ酸配列を配列番号2に記す。

[0123] 2) -1-3 EPHA3を発現するベクターの構築

シグナル配列のないヒトEPHA3をコードするDNA断片 (配列番号5)
) をプライマーセット

5' -GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCA
GAACTGATTCCGCAGCCT-3' (EPHA3-Fw : 配列番
号7)

5' -GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT
TACACGGGAAGCTGGGCC-3' (EPHA3-Re : 配列番号
8)

を使用しPCRで増幅した。このPCR断片をBP組換え反応によりエントリーベクターpDONR221にトランスファーした。そして、このエントリーベクターからLR組換え反応によってEPHA3をコードする遺伝子をpFLAG-GWにトランスファーした。この結果できたベクターをpFLAG-EPHA3と名づけた。なお、配列番号5のアミノ酸配列を配列番号

6 に記す。

[0124] 2) - 1 - 4 E P H A 4 を発現するベクターの構築

シグナル配列のないヒト E P H A 4 をコードする D N A 断片 (配列番号 9) をプライマーセット

5' - G G G G A C A A G T T T T G T A C A A A A A A G C A G G C T C A
G T C A C G G G T T C C A G G G T A - 3' (E P H A 4 - F w : 配列番号 1 1)

5' - G G G G A C C A C T T T T G T A C A A G A A A G C T G G G T C T
C A G A C G G G A A C C A T T C T G - 3' (E P H A 4 - R e : 配列番号 1 2)

を使用し P C R で増幅した。この P C R 断片を B P 組換え反応によりエントリーベクター p D O N R 2 2 1 にトランスファーした。そして、このエントリーベクターから L R 組換え反応によって E P H A 4 をコードする遺伝子を p F L A G - G W にトランスファーした。この結果できたベクターを p F L A G - E P H A 4 と名づけた。なお、配列番号 9 のアミノ酸配列を配列番号 1 0 に記す。

[0125] 2) - 1 - 5 E P H A 5 を発現するベクターの構築

シグナル配列のないヒト E P H A 5 をコードする D N A 断片 (配列番号 1 3) をプライマーセット

5' - G G G G A C A A G T T T T G T A C A A A A A A G C A G G C T T C
A G C C C C A G C A A C G A A G T G A A T T T T A T T G G - 3' (E P
H A 5 - F w : 配列番号 1 5)

5' - G G G G A C C A C T T T T G T A C A A G A A A G C T G G G T C T
T A C A A T G G C A C C A T T C C G T T T A C C A G - 3' (E P H A
5 - R e : 配列番号 1 6)

を使用し P C R で増幅した。この P C R 断片を B P 組換え反応によりエントリーベクター p D O N R 2 2 1 にトランスファーした。そして、このエントリーベクターから L R 組換え反応によって E P H A 5 をコードする遺伝子を

pFLAG-GWにトランスファーした。この結果できたベクターをpFLAG-EPHA5と名づけた。なお、配列番号13のアミノ酸配列を配列番号14に記す。

[0126] 2) -1-6 EPHA6を発現するベクターの構築

ヒトEPHA6のDNA断片（配列番号17）をプライマーセット

5' -GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCA
TGGCCAGGCGACTGCAG-3' (EPHA6-Fw : 配列番号
19)

5' -GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT
CATACATGAAATCCCTTC-3' (EPHA6-Re : 配列番
号20)

を使用しPCRで増幅した。このPCR断片をBP組換え反応によりエントリーベクターpDONR221にトランスファーした。次にGeneArt（登録商標）Site-directed Mutagenesis System（Life Technologies社、Thermo Fisher Scientific社）とプライマーセット

5' -TCCAACAACCAAGTTGTGTTGCTTGATAC-3'
' (EPHA6-Mut-Fw : 配列番号21)

5' -CAACACAACCTTGGTTGTTGGATGAGCCTGCT
TTTTTG-3' (EPHA6-Mut-Re : 配列番号22)

を用いて、このベクターから配列番号17に示される核酸配列の1乃至24番目までの塩基が削除された。そして、このエントリーベクターからLR組換え反応によってEPHA6をコードする遺伝子をpFLAG-GWにトランスファーした。この結果できたベクターをpFLAG-EPHA6と名づけた。なお、配列番号17のアミノ酸配列を配列番号18に記す。

[0127] 2) -1-7 EPHA7を発現するベクターの構築

シグナル配列のないヒトEPHA7をコードするDNA断片（配列番号23）をプライマーセット

5' - GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCA
CAGGCTGCGAAGGAAGTAC-3' (EPHA7-Fw : 配列
番号25)

5' - GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT
CACACTTGAATGCCAGTTTC-3' (EPHA7-Re : 配列
番号26)

を使用しPCRで増幅した。このPCR断片をBP組換え反応によりエントリーベクターpDONR221にトランスファーした。そして、このエントリーベクターからLR組換え反応によってEPA7をコードする遺伝子をpFLAG-GWにトランスファーした。この結果できたベクターをpFLAG-EPA7と名づけた。なお、配列番号23のアミノ酸配列を配列番号24に記す。

[0128] 2) - 1 - 8 EPHB1を発現するベクターの構築

シグナル配列のないヒトEPHB1をコードするDNA断片 (配列番号27) をプライマーセット

5' - GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCA
ATGGAAGAAACGTTAATGGAC-3' (EPHB1-Fw :
配列番号29)

5' - GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT
CATGCCATTGCCGTTGG-3' (EPHB1-Re : 配列番号
30)

を使用しPCRで増幅した。このPCR断片をBP組換え反応によりエントリーベクターpDONR221にトランスファーした。そして、このエントリーベクターからLR組換え反応によってEPHB1をコードする遺伝子をpFLAG-GWにトランスファーした。この結果できたベクターをpFLAG-EPHB1と名づけた。なお、配列番号27のアミノ酸配列を配列番号28に記す。

[0129] 2) - 1 - 9 EPHB3を発現するベクターの構築

シグナル配列のないヒトEPHB3をコードするDNA断片（配列番号31）をプライマーセット

5' -GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCACTGGAAGAGACCCTCATG-3'（EPHB3-Fw：配列番号33）

5' -GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGACCTGCACAGGCAG-3'（EPHB3-Re：配列番号34）

を使用しPCRで増幅した。このPCR断片をBP組換え反応によりエントリーベクターpDONR221にトランスファーした。そして、このエントリーベクターからLR組換え反応によってEPHB3をコードする遺伝子をpFLAG-GWにトランスファーした。この結果できたベクターをpFLAG-EPHB3と名づけた。なお、配列番号31のアミノ酸配列を配列番号32に記す。

[0130] 2) -1-10 EPHB4を発現するベクターの構築

シグナル配列のないヒトEPHB4をコードするDNA断片（配列番号35）をプライマーセット

5' -GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCA TTGGAAGAGACCCTGCTG-3'（EPHB4-Fw：配列番号37）

5' -GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGTACTGCGGGGCCG-3'（EPHB4-Re：配列番号38）

を使用しPCRで増幅した。このPCR断片をBP組換え反応によりエントリーベクターpDONR221にトランスファーした。そして、このエントリーベクターからLR組換え反応によってEPHB4をコードする遺伝子をpFLAG-GWにトランスファーした。この結果できたベクターをpFLAG-EPHB4と名づけた。なお、配列番号35のアミノ酸配列を配列番

号36に記す。

[0131] 2) -1-11 PTPRS isoform 2を発現するベクターの構築

シグナル配列のないヒトPTPRS isoform 2 (以下、PTPRS-2と記す)をコードするDNA断片(配列番号39)をプライマーセット

5' -GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC
GAAGAGCCCCCAGGTTTATC-3' (PTPRS-2/4
-Fw : 配列番号41)

5' -GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT
TAGGTTGCATAGTGGTCAAAG-3' (PTPRS-2/4
-Re : 配列番号42)

を使用しPCRで増幅した。このPCR断片をBP組換え反応によりエントリーベクターpDONR221にトランスファーした。そして、このエントリーベクターからLR組換え反応によってPTPRS-2をコードする遺伝子をpFLAG-GWにトランスファーした。この結果できたベクターをpFLAG-PTPRS-2と名づけた。なお、配列番号39のアミノ酸配列を配列番号40に記す。

[0132] 2) -1-12 PTPRS isoform 4を発現するベクターの構築

シグナル配列のないヒトPTPRS isoform 4 (以下、PTPRS-4と記す)をコードするDNA断片(配列番号43)を配列番号41及び42に示されたプライマーセットを使用しPCRで増幅した。このPCR断片をBP組換え反応によりエントリーベクターpDONR221にトランスファーした。そして、このエントリーベクターからLR組換え反応によってPTPRS-4をコードする遺伝子をpFLAG-GWにトランスファーした。この結果できたベクターをpFLAG-PTPRS-4と名づけた。なお、配列番号43のアミノ酸配列を配列番号44に記す。

[0133] 2) - 1 - 13 PTPRF isoform 2を発現するベクターの構築

シグナル配列のないヒトPTPRF isoform 2 (以下、PTPRF-2と記す) をコードするDNA断片 (配列番号45) をプライマーセット

5' - GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC
GACAGCAAACCTGTCTTTCATTAAAG-3' (PTPRF-2-Fw : 配列番号47)

5' - GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT
TACGTTGCATAGTGGTCAAAGCTG-3' (PTPRF-2-Re : 配列番号48)

を使用しPCRで増幅した。このPCR断片をBP組換え反応によりエントリーベクターpDONR221にトランスファーした。そして、このエントリーベクターからLR組換え反応によってPTPRF-2をコードする遺伝子をpFLAG-GWにトランスファーした。この結果できたベクターをpFLAG-PTPRF-2と名づけた。なお、配列番号45のアミノ酸配列を配列番号46に記す。

[0134] 2) - 2 IHCスクリーニング

2) - 2 - 1 培養上清を用いたIHCスクリーニング

293 α 細胞 (インテグリン α v及びインテグリン β 3を発現するHEK293由来の安定発現細胞株) に、Lipofectamine 2000 (Life Technologies社、Thermo Fisher Scientific社) を用いて、pFLAG-EPHA2をトランスフェクションした (以下、EPHA2発現293 α 細胞)。EPHA2発現293 α 細胞のパラフィンブロックを作製するために、この細胞のペレットをホルマリンで固定し、パラフィンで包埋した。トランスフェクションしていない293 α 細胞および内在性EPHA2発現MDA-MB-231細胞 (ATCC : No. HTB-26) についても同様にホルマリン固定後にパラ

フィンで包埋した。これらのブロックから切片を調製し、自動免疫染色装置 Ventana Discovery ULTRA および DAB map kit (以上、Roche Diagnostics 社) または Autostainer Link 48 および EnVision FLEX Mini Kit (DAKO 社) を用いて機器の使用説明書にしたがって、ハイブリドーマ由来の培養上清に含まれる抗体の IHC スクリーニングを実施した。まず、実施例 1) - 2) において取得された 67 個のハイブリドーマ由来の培養上清の中から、E P H A 2 発現 293 α 細胞に強く反応し、且つトランスフェクションしていない 293 α 細胞に反応しない 12 個の抗体を選抜した。さらに MDA-MB-231 細胞に反応する 6 個を選抜し、それらの中から内在性 E P H A 2 に強く反応する 3 個を選抜した。

[0135] 2) - 2 - 2 精製抗体を用いた IHC スクリーニング

実施例 2) - 2 - 1 で選抜された 3 種の抗体を、これらの抗体を産生するハイブリドーマの培養上清より精製し、実施例 2) - 2 - 1 と同様の方法でヒトの食道癌 (C R 2)、胃癌 (C Q 2)、大腸癌 (C D A 3)、子宮頸癌 (C Z A 2)、肺癌 (C C A 4)、咽喉頭癌 (C H 3)、悪性黒色腫 (L M 4 8 1)、及び正常組織 (M A N、M B N、M C N) の市販パラフィン切片 (以上、SuperBioChips Laboratories 社) を染色した。3 個の中から、腫瘍細胞に強く反応し、バックグラウンド染色の低い A 2 0 1 および A 2 0 5 を選抜した。

[0136] 2) - 3 抗体のアイソタイプ決定

マウス抗ヒト E P H A 2 抗体である A 2 0 1 および A 2 0 5 のアイソタイプは、Mouse monoclonal isotyping test kit (AbD Serotec 社) により決定された。その結果、A 2 0 1 のアイソタイプは I g G 1、A 2 0 5 のアイソタイプは I g G 2 b であることが示された。

[0137] 2) - 4 フローサイトメトリー解析用抗原遺伝子発現細胞の調製

Free style 293 F 細胞 (Life Technolog i

es社、Thermo Fisher Scientific社。以下、293F細胞)を 1×10^6 細胞/mLに調製し、このうち、8mLをErlenmeyer Flask with Vent Cap (125mL)に播種した。pFLAG-EPHA2、ならびにEPHA2と配列類似性を持つ蛋白質をコードするpFLAG-EPHA3、pFLAG-EPHA5、pFLAG-EPHA6、pFLAG-EPHA7、pFLAG-EPHB1、pFLAG-EPHB3、pFLAG-EPHB4、pFLAG-PTPRS-2、pFLAG-PTPRS-4、およびpFLAG-PTPRF-2とコントロールとしてpFLAG-GWをそれぞれ293F細胞に293fectin(Life Technologies社、Thermo Fisher Scientific社)を用いてトランスフェクションし、37℃、125rpm、8% CO₂の条件下で一晩培養した。翌日、これら293F細胞を回収し、細胞を洗浄した後、この細胞をフローサイトメトリー解析に使用した。

[0138] 2) -5 フローサイトメトリーによるマウス抗ヒトEPHA2抗体の結合能評価

A201とA205のEPHA2に対する結合特異性を評価するため、実施例2) -4で示す方法により調製したそれぞれの細胞に、A201、A205、マウスIgGコントロール抗体(Becton Dickinson社)、及びAnti-FLAG M2抗体(Sigma-Aldrich社)を加え、4℃で30分間インキュベートした。これらの細胞を5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、5% FBS含有PBSで500倍に希釈したAnti-Mouse IgG FITC conjugate(MP Bio社)を加え、4℃で20分間インキュベートした。そして、これらの細胞を5% FBS含有PBSで2回洗浄した後、 $2 \mu\text{g/mL}$ の7-Amininoactinomycin D(Life Technologies社、Thermo Fisher Scientific社)を含む5% FBS含有PBSに再懸濁し、フローサイトメーター(FACS Canto

11、BD Biosciences社)で解析した。データ解析はFlowjoで行った。7-Aminoactinomycin D陽性の死細胞をゲートで除外した後、生細胞のFITC蛍光強度のヒストグラムを作成した。

[0139] トランスフェクションした遺伝子が293F細胞で発現しているかを確認するため、FLAGタグへのAnti-FLAG M2抗体の結合を調べた。その結果、トランスフェクションされた全ての遺伝子(EPHA2, EPHA3, EPHA5, EPHA6, EPHA7, EPHB1, EPHB3, EPHB4, PTPRS-2, PTPRS-4, およびPTPRF-2)の発現が確認された(図1)。A201は、EPHA2に結合を示した。EPHB1にもわずかに結合するものの、それ以外のEPHA2と配列類似性を持つ分子(EPHA3, EPHA5, EPHA6, EPHA7, EPHB3, EPHB4, PTPRS-2, PTPRS-4, およびPTPRF-2)にはほとんど結合しないことが示された(図2)。A205は、EPHA2と結合する一方で、EPHA2と配列類似性を持つ分子(EPHA3, EPHA5, EPHA6, EPHA7, EPHB1, EPHB3, EPHB4, PTPRS-2, PTPRS-4, およびPTPRF-2)に対しては結合しないことが示された(図3)。なお、A205は陰性対照であるpFLAG-GWをトランスフェクションした細胞に対しても結合したが、これは内在的に293F細胞に発現するEPHA2に対してもA205が結合しているためと推測された。

[0140] (実施例3) マウス抗ヒトEPHA2抗体をコードするcDNAのヌクレオチド配列の決定

[0141] 3)-1 マウス抗ヒトEPHA2抗体A201の重鎖及び軽鎖断片をコードするcDNAのヌクレオチド配列の決定

[0142] 3)-1-1 A201産生ハイブリドーマからのtotal RNAの調製

A201産生ハイブリドーマよりTRIzol Reagent (Amb

ion社)を用いてtotal RNAを調製した。

[0143] 3) - 1 - 2 cDNA (5' - RACE - Ready cDNA) の合成

実施例3) - 1 - 1で調製したtotal RNAの1 μ gとSMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech社)を用いてcDNA (5' - RACE - Ready cDNA) を合成した。

[0144] 3) - 1 - 3 5' - RACE PCRによるA201の重鎖断片をコードするcDNAの増幅とヌクレオチド配列の決定

A201の重鎖断片をコードするcDNAをPCRで増幅するためのプライマーとして、UPM (Universal Primer A Mix: SMARTer RACE cDNA Amplification Kitに付属)、及び

5' - CATCCCAGGGTCACCATGGAGTTAGTTTGG-
3' (mG1VR1: 配列番号49)を用いた。mG1VR1はデータベースのマウス重鎖(IgG1)の定常領域の配列から設計した。

[0145] これらプライマーと、鋳型として実施例3) - 1 - 2で合成したcDNA (5' - RACE - Ready cDNA)を用い、5' - RACE PCRによりA201の重鎖断片をコードするcDNAを増幅した。このPCRは、PolymeraseとしてKOD-Plus- (TOYOBO社)を用い、SMARTer RACE cDNA Amplification Kitのマニュアルに従い、タッチダウンPCRプログラムで実施した。

[0146] 5' - RACE PCRで増幅した重鎖断片をコードするcDNAをMinElute PCR Purification Kit (QIAGEN社)を用いて精製後、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen社)を用いてクローニングし、クローニングされたcDNAの配列決定を行った。

[0147] シークエンシングプライマーとして、

5' -CATCCCAGGGTCACCATGGAGTTAGTTTGG-
3' (mG1VR1: 配列番号49)、及びNUP (Nested Universal Primer A: SMARTer RACE cDNA Amplification Kitに付属) を用いた。

[0148] シークエンス反応は、GeneAmp 9700 (Applied Biosystems社) で行い、DNAの配列決定はABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems社) あるいはApplied Biosystems 3730xl Analyzer (Applied Biosystems社) で行った。

[0149] 決定されたA201の重鎖をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号50に示し、アミノ酸配列を配列番号51に示した。配列番号51の1乃至19番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はA201重鎖のシグナル配列に相当し、20乃至137番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はA201の重鎖可変領域に相当する。配列番号50および配列番号51は図7にも示されている。

[0150] 3) -1-4 5' -RACE PCRによるA201の軽鎖断片をコードするcDNAの増幅とヌクレオチド配列の決定

A201の軽鎖断片をコードするcDNAをPCRで増幅するためのプライマーとして、UPM (Universal Primer A Mix: SMARTer RACE cDNA Amplification Kitに付属)、及び

5' -AGTCCAAC TGTTCAGGACGCCATTTTGTCTCG-
3' (mKVR2: 配列番号52) を用いた。なお、mKVR2はデータベースのマウス軽鎖の定常領域の配列から設計した。

[0151] これらのプライマーと、鋳型として実施例3) -1-2で合成したcDNA (5' -RACE-Ready cDNA) を用い、5' -RACE PCRによりA201の軽鎖断片をコードするcDNAを増幅した。このPCRは、PolymeraseとしてKOD-Plus- (TOYOBO社)

を用い、SMARTer RACE cDNA Amplification Kitのマニュアルに従い、タッチダウンPCRプログラムで実施した。

[0152] 5' - RACE PCRで増幅した軽鎖断片をコードするcDNAをMinElute PCR Purification Kit (QIAGEN社)を用いて精製後、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen社)を用いてクローニングし、クローニングされたcDNAの配列決定を行った。

[0153] シークエンシングプライマーとして、
5' - AGTCCAACTGTTTCAGGACGCCATTTTGTGCG -
3' (mKVR2 : 配列番号52)、及びNUP (Nested Universal Primer A : SMARTer RACE cDNA Amplification Kitに付属)を用いた。

[0154] シークエンス反応は、GeneAmp 9700 (Applied Biosystems社)で行い、DNAの配列決定はABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems社)あるいはApplied Biosystems 3730xl Analyzer (Applied Biosystems社)で行った。

[0155] 決定されたA201の軽鎖をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列表の配列番号53に示し、アミノ酸配列を配列番号54に示した。配列番号54の1乃至19番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はA201軽鎖のシグナル配列に相当し、20乃至128番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はA201の軽鎖可変領域に相当する。配列番号53および配列番号54は図8にも示されている。

[0156] 3) - 2 マウス抗ヒトEPHA2抗体A205の重鎖及び軽鎖断片をコードするcDNAのヌクレオチド配列の決定

3) - 2 - 1 A205産生ハイブリドーマからのtotal RNAの調製

A205産生ハイブリドーマより実施例3) - 1 - 1と同様の方法でtotal RNAを調製した。

[0157] 3) - 2 - 2 cDNA (5' - RACE - Ready cDNA) の合成

cDNA (5' - RACE - Ready cDNA) は、実施例3) - 2 - 1で調製したtotal RNAの1 μ gを用い、実施例3) - 1 - 2と同様の方法で合成した。

[0158] 3) - 2 - 3 5' - RACE PCRによるA205の重鎖断片をコードするcDNAの増幅とヌクレオチド配列の決定

実施例3) - 2 - 2で合成したcDNA (5' - RACE - Ready cDNA) を鋳型として用いて、実施例3) - 1 - 3と同様の方法でA205の重鎖断片をコードするcDNAを増幅して配列を決定した。

[0159] ただし、A205の重鎖断片のcDNAをPCRで増幅するためのプライマーとして、UPM (Universal Primer A Mix : SMARTer RACE cDNA Amplification Kit に付属)、及び

5' - TGCACACTGCTGGACAGGGATCCAGAGTTTC -
3' (mG2bVR2 : 配列番号55) を用いた。なお、mG2bVR2はデータベースのマウス重鎖 (IgG2b) の定常領域の配列から設計した。

[0160] シークエンシングプライマーとして、

5' - TGCACACTGCTGGACAGGGATCCAGAGTTTC -
3' (mG2bVR2 : 配列番号55)、及びNUP (Nested Universal Primer A : SMARTer RACE cDNA Amplification Kit に付属) を用いた。

[0161] 決定されたA205の重鎖をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列表の配列番号56に示し、アミノ酸配列を配列番号57に示した。配列番号57の1乃至19番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はA205重鎖のシグナル配列に相当し、20乃至138番目のアミノ酸残基からなるア

ミノ酸配列はA205の重鎖可変領域に相当する。配列番号56および配列番号57は図9にも示されている。

[0162] 3) -2-4 5' -RACE PCRによるA205の軽鎖断片をコードするcDNAの増幅とヌクレオチド配列の決定

実施例3) -2-2で合成したcDNA (5' -RACE-Ready cDNA) を鋳型として用いて、実施例3) -1-4と同様の方法で抗体A205の軽鎖断片をコードするcDNAを増幅して配列を決定した。

[0163] 決定されたA205の軽鎖をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列表の配列番号58に示し、アミノ酸配列を配列番号59に示した。配列番号59の1乃至19番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はA205軽鎖のシグナル配列に相当し、20乃至133番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はA205の軽鎖可変領域に相当する。配列番号58および配列番号59は図10にも示されている。

[0164] (実施例4) マウス抗ヒトEPHA2抗体の生産

マウス抗ヒトEPHA2抗体A201およびA205は、ハイブリドーマ培養上清から精製した。

[0165] まず、A201およびA205産生ハイブリドーマをClonaCell -HY Selection Medium Eで十分量まで増殖させた後、Ultra Low IgG FBS (Life Technologies社、Thermo Fisher Scientific社) を20%添加したHybridoma SFM (Life Technologies社、Thermo Fisher Scientific社) に培地交換し、5日間培養した。本培養上清を回収し0.45 μ mのフィルターを通して滅菌した。

[0166] 抗体は、上記のハイブリドーマ上清からProtein Gアフィニティークロマトグラフィー (4~6℃下) 1段階工程で精製した。Protein Gアフィニティークロマトグラフィー精製後のバッファー置換工程は4~6℃下で実施した。最初に、0.2M リン酸ナトリウムバッファー (pH 7

、0)で平衡化したProtein G (GE Healthcare Bioscience社)が充填されたカラムにハイブリドーマの培養上清をアプライした。培養上清液がカラムに全て入ったのち、カラム容量2倍以上のリン酸ナトリウムバッファーでカラムを洗浄した。次に0.1 Mグリシン／塩酸水溶液 (pH 2.7)で溶出し、抗体の含まれる画分を集めた。集めた画分に1 M Tris-HCl (pH 9.0)を加えてpH 7.0~7.5に調製した後に、Amicon Ultra 4 (分画分子量UF 50 K、Merck Millipore社、4~6℃下)にて0.02% NaNO₃／PBSへのバッファー置換を行うとともに濃縮を行い、抗体濃度を0.3 mg/mL以上に調製し、精製サンプルとした。

[0167] (実施例5) マウス抗ヒトE PHA 2抗体による免疫組織染色

図4に免疫組織化学染色におけるマウス抗E PHA 2抗体の特異度を示す。図4に示すEphファミリー分子を293F細胞に一過性発現させ、それらの細胞のペレットをホルマリン固定後にパラフィンで包埋した。それらのブロックから調製した切片にTris-EDTA溶液 (DAKO社)で97℃、40分間抗原賦活化処理を施し、内因性ペルオキシダーゼ (HRP) ブロッキング試薬 (DAKO社) 5分、非特異タンパク吸着ブロッキング試薬 (DAKO社) 30分の順に反応させた後、抗体希釈液 (DAKO社)で2.5 μg/mLの濃度に調製したマウス抗E PHA 2抗体A201またはA205を1時間反応させた。HRP標識ユニバーサル二次抗体 (DAKO社)、DAB発色基質 (DAKO社)を用いて常法にて免疫組織化学染色を実施した。顕微鏡観察により、両抗体はE PHA 2発現細胞に強く結合し、E PHA 2を認識することが確認された。なお、A201はE PHA 4発現細胞にもわずかに結合したが、強制発現細胞に対する極めて弱い交差反応であり、ヒト組織では問題にならない程度と判断された。

[0168] 図5にマウス抗E PHA 2抗体A201による免疫組織化学染色の結果を示す。市販のヒト咽喉頭癌および胃癌の組織マイクロアレイ (SuperBioChips Laboratories社)にTris-EDTA溶液

(DAKO社)で97℃、40分間抗原賦活化処理を施し、内因性ペルオキシダーゼ(HRP)ブロッキング試薬(DAKO社)5分、非特異タンパク吸着ブロッキング試薬(DAKO社)30分の順に反応させた後、抗体希釈液(DAKO社)で5 μ g/mLの濃度に調製したマウス抗EPHA2抗体A201を1時間反応させた。HRP標識ユニバーサル二次抗体(DAKO社)、DAB発色基質(DAKO社)を用いて常法にて免疫組織化学染色を実施した。抗原賦活化処理以外の反応は室温にて実施した。図5は顕微鏡写真であり、マウス抗EPHA2抗体A201により、喉頭部扁平上皮癌および胃腺癌の腫瘍細胞の細胞膜および細胞質の一部に特異的な染色が認められる。腫瘍間質の組織および細胞には染色は認められない。腫瘍組織と間質組織は形態学的な相違により識別できる。

[0169] 図6にマウス抗EPHA2抗体A205による免疫組織化学染色の結果を示す。市販のヒト咽喉頭癌および胃癌の組織マイクロアレイ(SuperBioChips Laboratories社)にTris-EDTA溶液(DAKO社)で97℃、40分間抗原賦活化処理を施し、内因性HRPブロッキング試薬(DAKO社)5分、非特異タンパク吸着ブロッキング試薬(DAKO社)30分の順に反応させた後、抗体希釈液(DAKO社)で15 μ g/mLの濃度に調製したマウス抗EPHA2抗体A205を1時間反応させた。抗マウスリンカー抗体(DAKO社)、HRP標識ユニバーサル二次抗体(DAKO社)、DAB発色基質(DAKO社)を用いて常法にて免疫組織化学染色を実施した。抗原賦活化処理以外の反応は室温にて実施した。図6は顕微鏡写真であり、マウス抗EPHA2抗体A205により、喉頭部扁平上皮癌および胃腺癌の腫瘍細胞の細胞膜および細胞質の一部に特異的な染色が認められる。腫瘍間質の組織および細胞には染色は認められない。腫瘍組織と間質組織は形態学的な相違により識別できる。

[0170] マウス抗EPHA2抗体A201とA205によって同じ部位が染色されているが、A205よりもA201のほうが感度が高く、より多くの腫瘍細胞が染色されている。

[0171] (実施例6) マウス抗ヒトE P H A 2抗体による免疫組織染色

図13および14に免疫組織化学染色における抗E P H A 2抗体の染色条件および染色性を示す。E P H A 2非発現293 α 細胞、E P H A 2過剰発現293 α 細胞、およびE P H A 2内因性発現MDA-MB-231細胞のペレットをホルマリン固定後にパラフィンで包埋した。それらのブロックから調製した切片にT r i s - E D T A溶液(D A K O社乃至はR o c h e D i a g n o s t i c s社)で97℃、36分間乃至40分間抗原賦活化処理を施し、常法にて内因性ペルオキシダーゼ(H R P)ブロッキング、非特異タンパク吸着ブロッキングを行った後、予備検討により最適化した濃度(図13)に調製した各抗E P H A 2抗体を1時間反応させた。検出にはR o c h e D i a g n o s t i c s社乃至はD A K O社のキットを用い、L S A B法乃至はポリマー法で免疫組織化学染色を実施した。顕微鏡観察により、細胞膜または細胞質に明確な陽性反応が認められる場合をプラス、弱い陽性反応が認められる場合はプラスマイナスとした。A201およびA205の両抗体は、E P H A 2過剰発現293 α 細胞およびE P H A 2内因性発現MDA-MB-231細胞の両方に強い陽性反応を示し、比較した市販の各種E P H A 2抗体よりも高い感度でE P H A 2を認識することが確認された(図13)。なお、検討した市販の各種E P H A 2抗体の中では、R & D S y s t e m s社のヤギ抗E P H A 2ポリクローナル抗体(A F 3 0 3 5)が最も感度および特異性に優れると判断された。図14は細胞の顕微鏡写真であり、全ての抗体でE P H A 2非発現293 α 細胞には陽性反応は認められない一方、E P H A 2過剰発現293 α 細胞では細胞膜および細胞質に強い陽性反応が認められる。MDA-MB-231細胞については、マウス抗E P H A 2抗体A201およびA205、ならびにR & D S y s t e m s社ヤギ抗E P H A 2ポリクローナル抗体(A F 3 0 3 5)により細胞膜に強い陽性反応、S a n t a C r u z社ウサギ抗E P H A 2ポリクローナル抗体(s c - 9 2 4)およびC e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g y社ウサギ抗E P H A 2モノクローナル抗体(6997)により細胞膜

に弱い陽性反応が認められる。なお、Millipore社のマウス抗E P H A 2抗体（D 4）では、細胞全体に高い非特異染色が認められた。

[0172] 図15～18にマウス抗E P H A 2抗体A 2 0 1およびA 2 0 5、R & D Systems社ヤギ抗E P H A 2ポリクローナル抗体（A F 3 0 3 5）、ならびにS a n t a C r u z社ウサギ抗E P H A 2ポリクローナル抗体（s c - 9 2 4）による免疫組織化学染色の結果を示す。市販のヒト腫瘍組織マイクロアレイ（SuperBioChips Laboratories社）にT r i s - E D T A溶液（D A K O社）で97℃、40分間抗原賦活化処理を施し、前述と同様の方法でブロッキングを行った後、抗体希釈液（D A K O社）で希釈した各抗E P H A 2抗体を1時間反応させた。H R P 標識ユニバーサル二次抗体（D A K O社）乃至はH R P 標識抗ヤギI g G抗体（ニチレイバイオサイエンス社）、D A B発色基質（D A K O社）を用いて常法にて免疫組織化学染色を実施した。A 2 0 5抗体についてはH R P 標識ユニバーサル二次抗体の反応前に抗マウスリンカー抗体（D A K O社）を反応させた。図15～18は腫瘍組織の顕微鏡写真であり、ヒトの食道癌（図15）、子宮頸癌（図16）、大腸癌（図17）、胃癌（図18）の染色像である。いずれの癌においても、A 2 0 1抗体およびA 2 0 5抗体によって、腫瘍細胞の細胞膜および細胞質の一部に特異的な染色が認められ、A 2 0 5よりもA 2 0 1のほうが感度が高く、より多くの腫瘍細胞が染色されている。A F 3 0 3 5抗体およびs c - 9 2 4抗体では特異的な染色は認められないか、ごくわずかである。A 2 0 1抗体、A 2 0 5抗体、およびA F 3 0 3 5抗体では腫瘍間質の組織および細胞には染色は認められないが、s c - 9 2 4抗体では腫瘍間質の非腫瘍細胞にも交差反応が認められる。腫瘍組織と間質組織は形態学的な相違により識別できる。

産業上の利用可能性

[0173] 本発明の提供する抗体を用いることにより各種癌の検査または診断が可能となる。

配列表フリーテキスト

[0174] 配列番号 1 : ヒト E P H A 2 をコードするヌクレオチド配列

配列番号 2 : ヒト E P H A 2 のアミノ酸配列

配列番号 3 : P C R プライマー E P H A 2 - F w

配列番号 4 : P C R プライマー E P H A 2 - R e

配列番号 5 : ヒト E P H A 3 をコードするヌクレオチド配列

配列番号 6 : ヒト E P H A 3 のアミノ酸配列

配列番号 7 : P C R プライマー E P H A 3 - F w

配列番号 8 : P C R プライマー E P H A 3 - R e

配列番号 9 : ヒト E P H A 4 をコードするヌクレオチド配列

配列番号 10 : ヒト E P H A 4 のアミノ酸配列

配列番号 11 : P C R プライマー E P H A 4 - F w

配列番号 12 : P C R プライマー E P H A 4 - R e

配列番号 13 : ヒト E P H A 5 をコードするヌクレオチド配列

配列番号 14 : ヒト E P H A 5 のアミノ酸配列

配列番号 15 : P C R プライマー E P H A 5 - F w

配列番号 16 : P C R プライマー E P H A 5 - R e

配列番号 17 : ヒト E P H A 6 をコードするヌクレオチド配列

配列番号 18 : ヒト E P H A 6 のアミノ酸配列

配列番号 19 : P C R プライマー E P H A 6 - F w

配列番号 20 : P C R プライマー E P H A 6 - R e

配列番号 21 : プライマー E P H A 6 - M u t - F w

配列番号 22 : プライマー E P H A 6 - M u t - R e

配列番号 23 : ヒト E P H A 7 をコードするヌクレオチド配列

配列番号 24 : ヒト E P H A 7 のアミノ酸配列

配列番号 25 : P C R プライマー E P H A 7 - F w

配列番号 26 : P C R プライマー E P H A 7 - R e

配列番号 27 : ヒト E P H B 1 をコードするヌクレオチド配列

配列番号 28 : ヒト E P H B 1 のアミノ酸配列

配列番号29 : PCRプライマー EPHB1-Fw

配列番号30 : PCRプライマー EPHB1-Re

配列番号31 : ヒトEPHB3をコードするヌクレオチド配列

配列番号32 : ヒトEPHB3のアミノ酸配列

配列番号33 : PCRプライマー EPHB3-Fw

配列番号34 : PCRプライマー EPHB3-Re

配列番号35 : ヒトEPHB4をコードするヌクレオチド配列

配列番号36 : ヒトEPHB4のアミノ酸配列

配列番号37 : PCRプライマー EPHB4-Fw

配列番号38 : PCRプライマー EPHB4-Re

配列番号39 : ヒトPTPRS-2をコードするヌクレオチド配列

配列番号40 : ヒトPTPRS-2のアミノ酸配列

配列番号41 : PCRプライマー PTPRS-2/4-Fw

配列番号42 : PCRプライマー PTPRS-2/4-Re

配列番号43 : ヒトPTPRS-4をコードするヌクレオチド配列

配列番号44 : ヒトPTPRS-4のアミノ酸配列

配列番号45 : ヒトPTPRF-2をコードするヌクレオチド配列

配列番号46 : ヒトPTPRF-2のアミノ酸配列

配列番号47 : PCRプライマー PTPRF-2-Fw

配列番号48 : PCRプライマー PTPRF-2-Re

配列番号49 : PCRプライマー mG1VR1 (A201重鎖可変領域用)

配列番号50 : A201抗体重鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号51 : A201抗体重鎖のアミノ酸配列

配列番号52 : PCRプライマー mKVR2 (A201、A205軽鎖可変領域用)

配列番号53 : A201抗体軽鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号54 : A201抗体軽鎖のアミノ酸配列

配列番号 55 : PCRプライマー mG2bVR2 (A205 重鎖可変領域用)

配列番号 56 : A205 抗体重鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号 57 : A205 抗体重鎖のアミノ酸配列

配列番号 58 : A205 抗体軽鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号 59 : A205 抗体軽鎖のアミノ酸配列

配列番号 60 : A201 抗体のCDRH1のアミノ酸配列

配列番号 61 : A201 抗体のCDRH2のアミノ酸配列

配列番号 62 : A201 抗体のCDRH3のアミノ酸配列

配列番号 63 : A201 抗体のCDRL1のアミノ酸配列

配列番号 64 : A201 抗体のCDRL2のアミノ酸配列

配列番号 65 : A201 抗体のCDRL3のアミノ酸配列

配列番号 66 : A205 抗体のCDRH1のアミノ酸配列

配列番号 67 : A205 抗体のCDRH2のアミノ酸配列

配列番号 68 : A205 抗体のCDRH3のアミノ酸配列

配列番号 69 : A205 抗体のCDRL1のアミノ酸配列

配列番号 70 : A205 抗体のCDRL2のアミノ酸配列

配列番号 71 : A205 抗体のCDRL3のアミノ酸配列

請求の範囲

- [請求項1] 重鎖配列が、CDRH1、CDRH2、CDRH3を有する可変領域を含み、前記CDRH1は配列番号60に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRH2は配列番号61に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRH3は配列番号62に示されるアミノ酸配列からなること；
- 軽鎖配列が、CDRL1、CDRL2、CDRL3を有する可変領域を含み、前記CDRL1は配列番号63に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL2は配列番号64に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL3は配列番号65に示されるアミノ酸配列からなること；および
- 配列番号2に示されるEPHA2に特異的に結合すること；
- を特徴とする抗体または該抗体の抗原結合性断片。
- [請求項2] 配列番号51に示されるアミノ酸配列の20乃至137番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列および配列番号54に示されるアミノ酸配列の20乃至128番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする請求項1に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。
- [請求項3] 配列番号51に示されるアミノ酸配列の20乃至137番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列および配列番号54に示されるアミノ酸配列の20乃至128番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含み、重鎖定常領域のアイソタイプがIgG1であることを特徴とする請求項1または2に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。
- [請求項4] 重鎖配列が、CDRH1、CDRH2、CDRH3を有する可変領域を含み、前記CDRH1は配列番号66に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRH2は配列番号67に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRH3は配列番号68に示されるアミノ酸配列からなること；

ること；

軽鎖配列が、CDRL 1、CDRL 2、CDRL 3を有する可変領域を含み、前記CDRL 1は配列番号69に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL 2は配列番号70に示されるアミノ酸配列からなり、前記CDRL 3は配列番号71に示されるアミノ酸配列からなること；および

配列番号2に示されるE P H A 2に特異的に結合すること；

を特徴とする抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項5] 配列番号57に示されるアミノ酸配列の20乃至138番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列および配列番号59に示されるアミノ酸配列の20乃至133番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする請求項4に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項6] 配列番号57に示されるアミノ酸配列の20乃至138番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列および配列番号59に示されるアミノ酸配列の20乃至133番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含み、重鎖定常領域のアイソタイプがIgG2bであることを特徴とする請求項4または5に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項7] Fab、F(ab')₂、Fab' およびFvからなる群から選択される、請求項1、2、4または5のいずれか一つに記載の抗体の抗原結合性断片。

[請求項8] scFvであることを特徴とする、請求項1、2、4または5のいずれか一つに記載の抗体。

[請求項9] 請求項1乃至8のいずれか一つに記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片を含む組成物。

[請求項10] 請求項1乃至8のいずれか一つに記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片を含み、パラフィン包埋処理した後脱パラフィン処理した組

織標本（以下、単に「標本」という。）中のE P H A 2の検出または測定方法に使用される、請求項9に記載の組成物。

[請求項11] 請求項1乃至8のいずれか一つに記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片と被検標本を接触させる工程を含む、標本中のE P H A 2の検出または測定方法に使用される、請求項9または10に記載の組成物。

[請求項12] E P H A 2の検出または測定方法が、被検標本においてE P H A 2が検出もしくは測定されたか、または被検標本におけるE P H A 2の発現レベルもしくは発現量が事前に決定された基準と同等かまたはそれより高い場合、該被検標本を陽性と判定し、被検標本においてE P H A 2が検出もしくは測定されなかったか、または被検標本におけるE P H A 2の発現レベルもしくは発現量が事前に決定された基準と同等かまたはそれより低い場合、該被検標本を陰性と判定する工程を含む、請求項11に記載の組成物。

[請求項13] E P H A 2陽性疾患の検査または診断方法に使用される、請求項9乃至12のいずれか一つに記載の組成物。

[請求項14] E P H A 2陽性疾患の検査または診断方法が、E P H A 2の検出または測定において、陽性と判定された被検標本が由来する被験者は、E P H A 2に特異的に結合する抗体もしくは該抗体の抗原結合性断片を投与する工程を含むE P H A 2陽性疾患の治療または予防方法に適していると判定し、陰性と判定された被検標本が由来する被験者は、E P H A 2に特異的に結合する抗体もしくは該抗体の抗原結合性断片を投与する工程を含むE P H A 2陽性疾患の治療または予防方法には適していないと判定することを含む、請求項13に記載の組成物。

[請求項15] E P H A 2陽性疾患がE P H A 2陽性癌である、請求項13または14に記載の組成物。

[請求項16] 下記（i）乃至（i i i）のいずれか一つに記載の被験者に投与される、E P H A 2に特異的に結合する抗体もしくは該抗体の抗原結合

性断片を含む医薬組成物：

(i) 請求項 9 乃至 11 または 13 のいずれか一つに記載の組成物を用いて E P H A 2 が検出または測定された被検標本の由来する被験者；

(i i) 請求項 12 に記載の組成物を用いた E P H A 2 の検出または測定において陽性と判定された被検標本の由来する被験者；

(i i i) 請求項 14 または 15 に記載の組成物を用いて、E P H A 2 に特異的に結合する抗体もしくは該抗体の抗原結合性断片を投与する工程を含む E P H A 2 陽性疾患の治療または予防に適していると判定された被験者。

[請求項17] 請求項 1 乃至 8 のいずれか一つに記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片をコードするポリヌクレオチド。

[請求項18] 請求項 17 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

[請求項19] 請求項 17 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 18 に記載のベクターを含む細胞。

[請求項20] 下記の工程 (i) および (i i) を含む、請求項 1 乃至 8 のいずれか一つに記載のモノクローナル抗体または該抗体の抗原結合性断片の製造方法：

(i) 請求項 19 に記載の細胞を培養する工程；

(i i) 工程 (i) の培養物からモノクローナル抗体または該抗体の抗原結合性断片を回収する工程。

[請求項21] 抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 乃至 8 のいずれか一つに記載の抗体又はその抗原結合性断片。

[請求項22] 下記の工程 (i)、または (i) および (i i) を含む、E P H A 2 の検出または測定方法：

(i) 請求項 1 乃至 8 のいずれか一つに記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片又は請求項 9 に記載の組成物と被検標本を接触させる工程；

(i i) 該被検標本において E P H A 2 が検出もしくは測定されたか、または該被検標本における E P H A 2 の発現レベルもしくは発現量が事前に決定された基準と同等かまたはそれより高い場合、該被検標本を陽性と判定し、被検標本において E P H A 2 が検出もしくは測定されなかったか、また該被検標本における E P H A 2 の発現レベルもしくは発現量が事前に決定された基準と同等かまたはそれより低い場合、該被検標本を陰性と判定する工程。

[請求項23] 下記の工程 (i)、または (i) および (i i) を含む、E P H A 2 に特異的に結合する抗体もしくは該抗体の抗原結合性断片を含む医薬組成物を投与する個体の同定方法：

(i) 請求項 1 乃至 8 のいずれか一つに記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片又は請求項 9 に記載の組成物と個体由来のサンプルを接触させる工程；

(i i) 該個体由来のサンプルにおいて E P H A 2 が検出もしくは測定されたか、または該個体由来のサンプルにおける E P H A 2 の発現レベルもしくは発現量が事前に決定された基準と同等かまたはそれより高い場合、該個体を陽性と判定し、該個体由来のサンプルにおいて E P H A 2 が検出もしくは測定されなかったか、また該個体由来のサンプルにおける E P H A 2 の発現レベルもしくは発現量が事前に決定された基準と同等かまたはそれより低い場合、該個体を陰性と判定する工程。

[請求項24] E P H A 2 陽性疾患の検査または診断方法に使用される、請求項 2 または 2 3 に記載の方法。

[請求項25] E P H A 2 陽性疾患を罹患しているもしくはそのリスクがある個体の同定方法に使用される、請求項 2 3 に記載の方法。

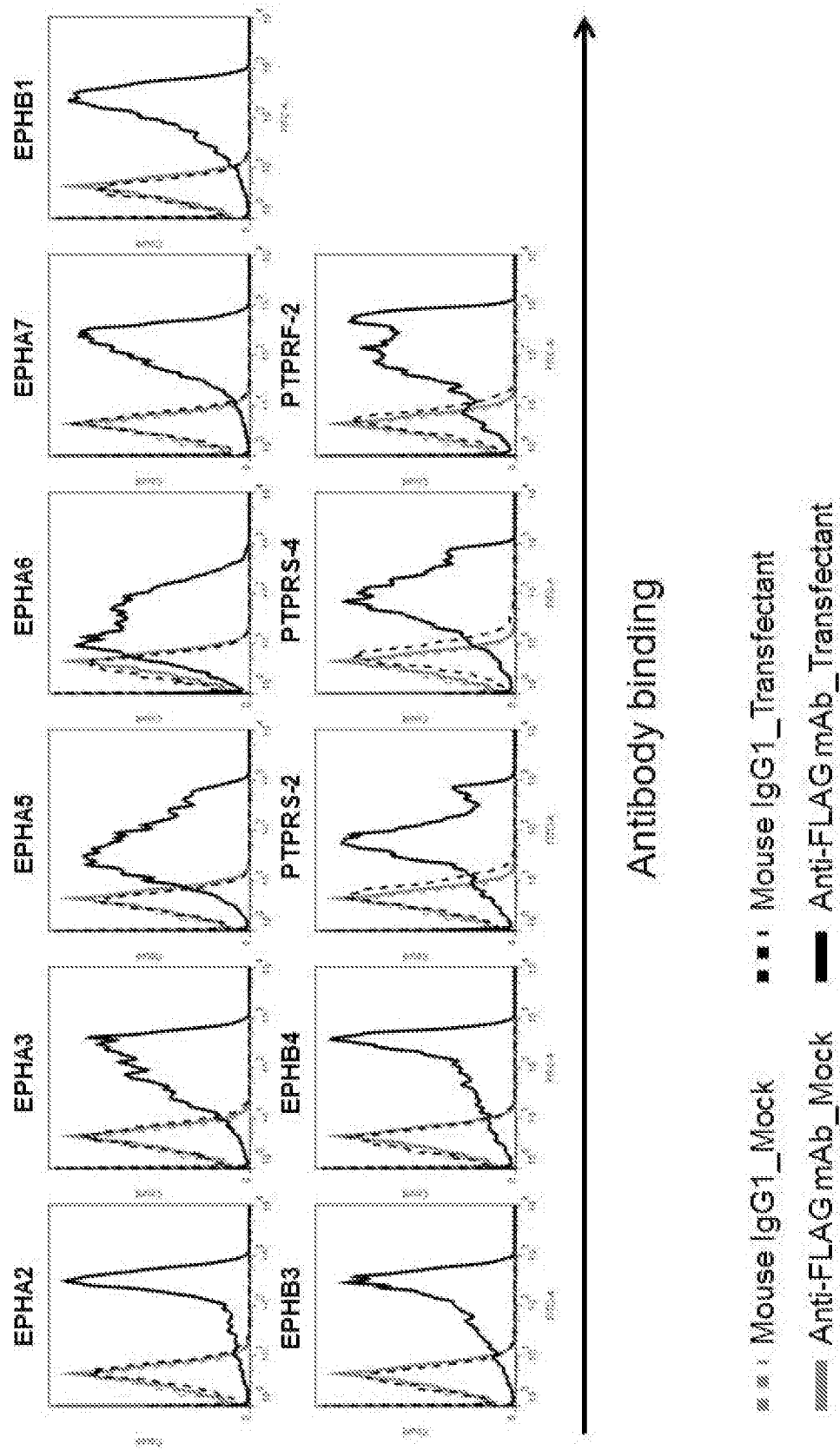
[請求項26] 請求項 1 6 の (i) 乃至 (i i i) のいずれか一つに記載の被験者に対し、E P H A 2 に特異的に結合する抗体もしくは該抗体の抗原結合性断片を含む医薬組成物を投与することを特徴とする、E P H A 2

陽性疾患の治療方法。

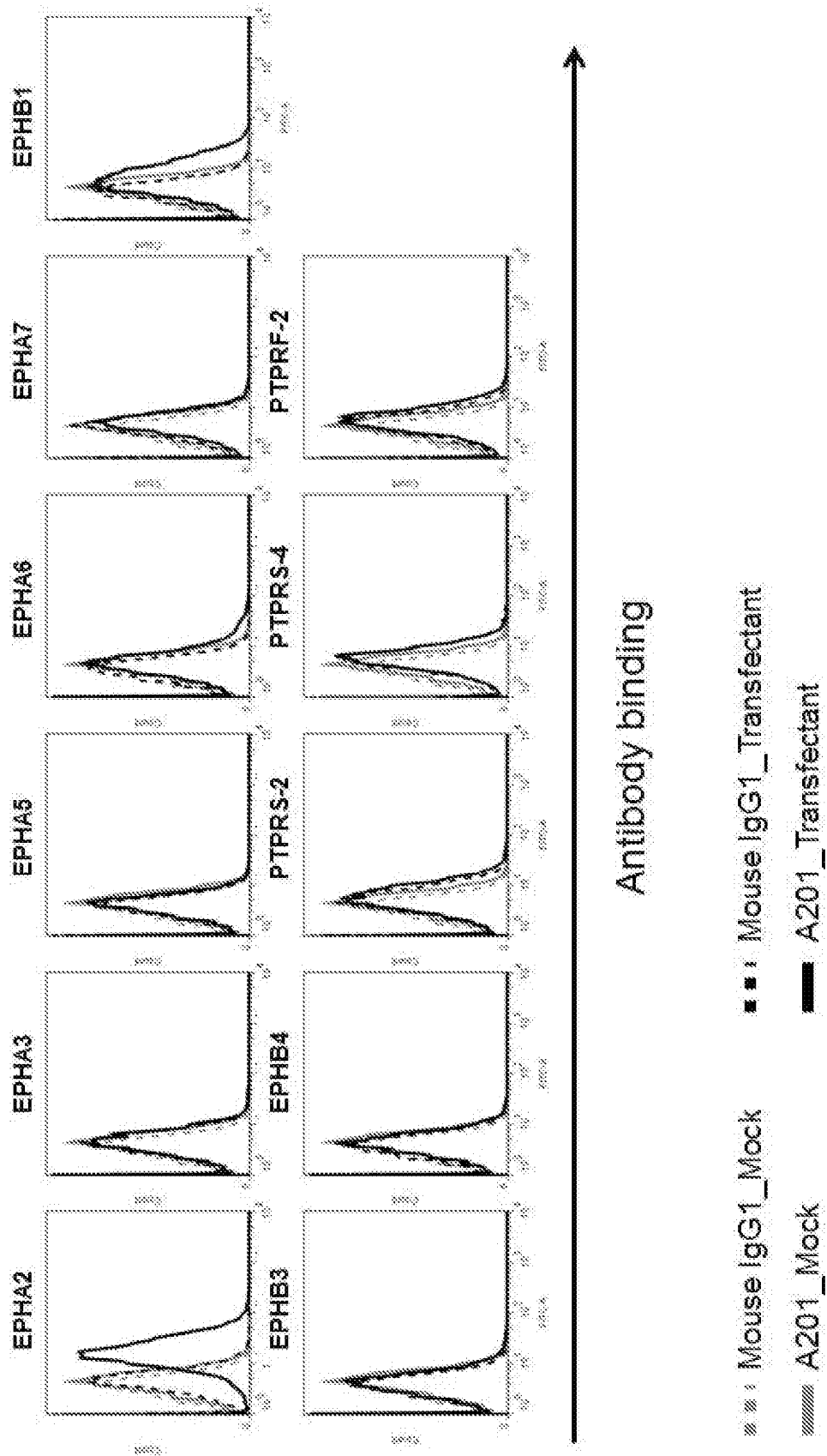
[請求項27] 請求項 1 乃至 8 のいずれか一つに記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片を含む、E P H A 2 陽性疾患を検査または診断するためのキット。

[請求項28] E P H A 2 陽性疾患がE P H A 2 陽性癌である、請求項 2 4 乃至 2 6 に記載の方法または請求項 2 7 に記載のキット。

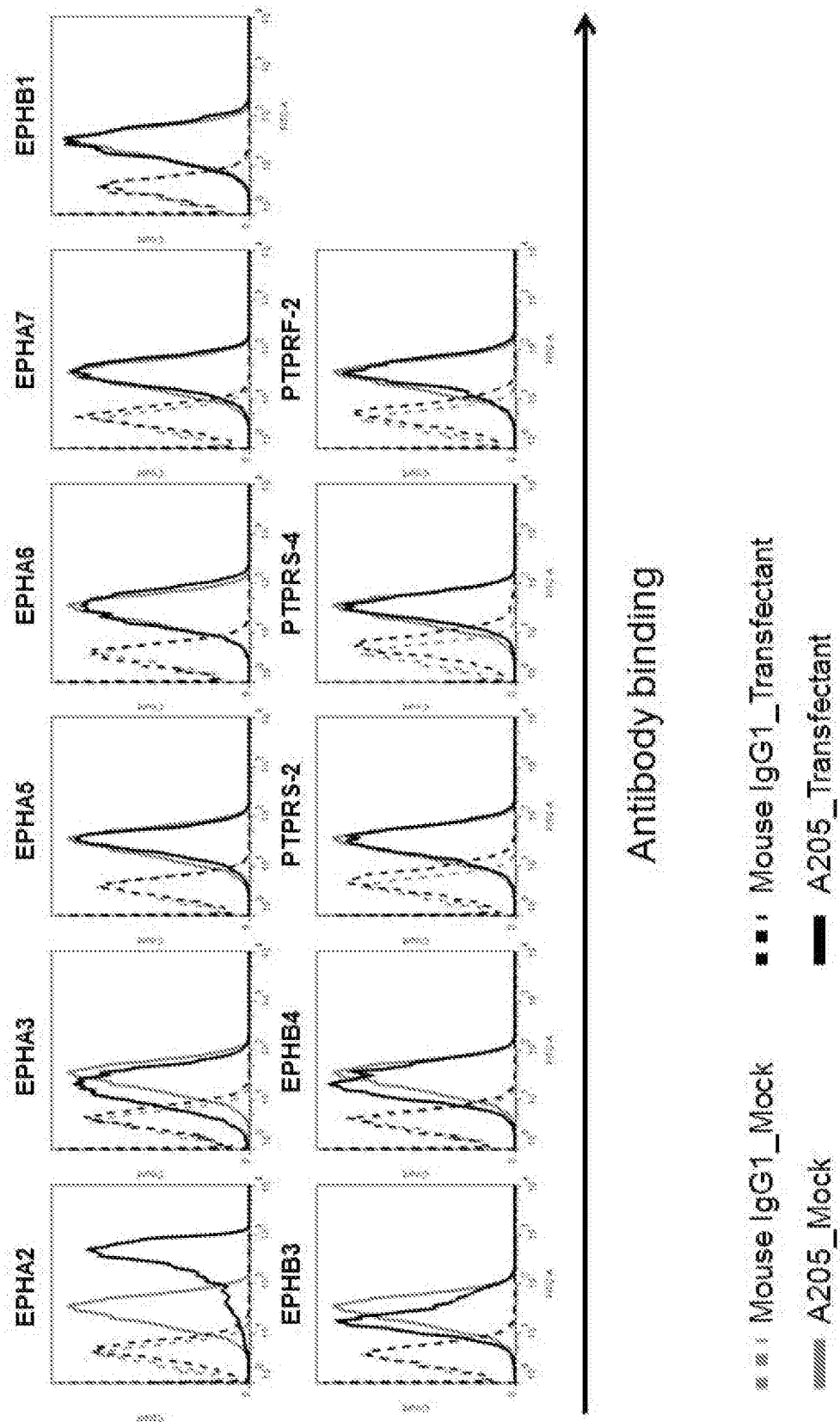
[1]



[2]



[図3]



[図4]

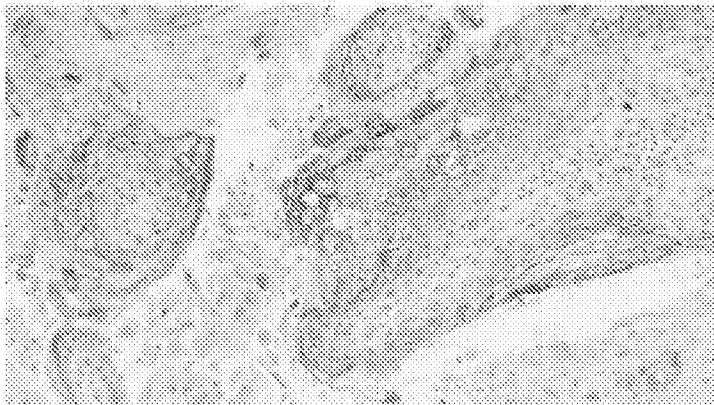
免疫染色におけるマウス抗EphA2抗体の特異性

Antibody	A201	A205
Epitope retrieval	Tris-EDTA (pH9.0)	Tris-EDTA (pH9.0)
Conc (ug/mL)	2.5	2.5
EPHA2	++	++
EPHA3	-	-
EPHA4	+/-*	-
EPHA5	-	-
EPHA6	-	-
EPHA7	-	-
EPHB3	-	-
EPHB4	-	-
PTPRSV2	-	-
PTPRSV4	-	-
PTPRFv2	-	-

*強制発現細胞における極めて弱い交差性反応であり、組織標本では問題とならない程度

[図5]

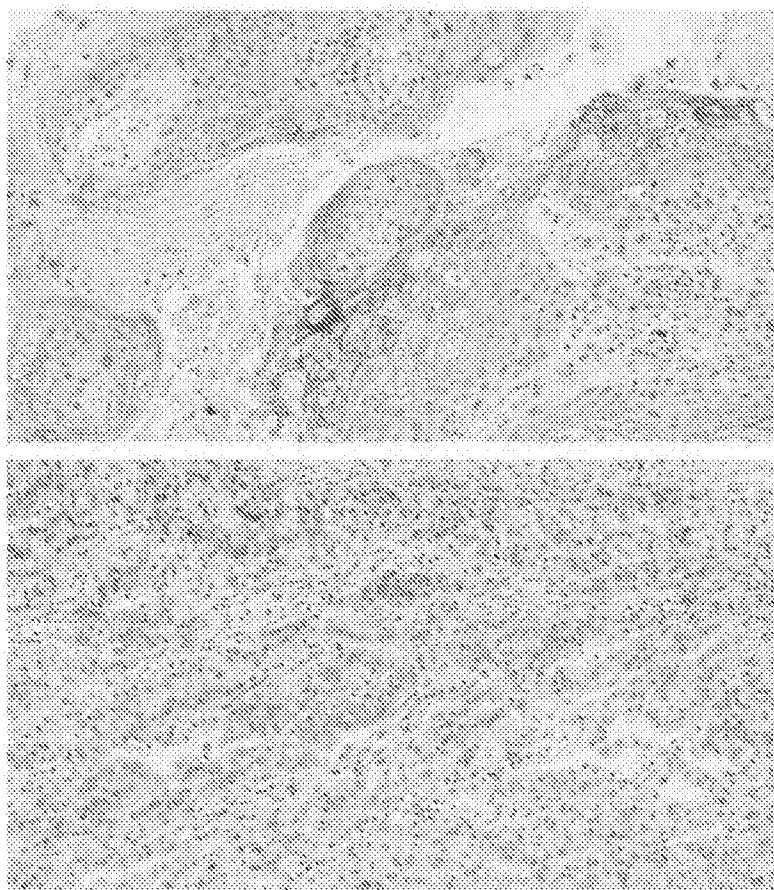
A201抗体による免疫染色



上：喉頭癌
下：胃癌

[図6]

A205抗体による免疫染色



上：喉頭癌
下：胃癌

[図7]

配列番号50 : A201抗体重鎖をコードするヌクレオチド配列

ATGAAATGCAGCTGGGTTATCTTCTTCCTGATGGCAGTGGTTACAGGGGTCAATTC
AGAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTC
AAGTTGTCCTGCACAGTTTCTGGCTTCACCTTTAAAGACACCTATGTGCACTGGGT
GAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAAT
GCTAATACGAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCTCTATAACAGCAGACAC
GTCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGCCATCTGAGGACACTGCC
GTCTATTACTGTGCTGCTTATGGTAAATCGGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGG
GACTCTGGTCACTGTCTCTGCGGCCAAAACGACA

シグナル配列 (1-57)、可変領域 (58-411)

配列番号51 : A201抗体重鎖のアミノ酸配列

MKCSWVIFFLMAVVTGVNSEVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTVSGFTFKDTYVHWV
KQRPEQGLEWIGRIDPANANTKYDPKFQKGKASITADTSSNTAYLQLSSLPS EDTAVYY
CAAYGKSAWFAYWGQGTLVTVSAAKTT

シグナル配列 (1-19)、可変領域 (20-137)

[図8]

配列番号53 : A201抗体軽鎖をコードするヌクレオチド配列

ATGTCCTCTGCTCAGTTCCTTGGTCTCCTGTTGCTCTGTTTTCAAGGTGCCAGATG
TGATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAG
TCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTGGCAATTATTTAAACTGGTATCAG
CAGAAACCAGATGGAAGTGTAAAGTCCTGATCTACTACACATCAAGATTACACTCA
GGAGTCCCATCGAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCAT
TAGCAACCTGGAACAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTCATTAC
TTCTCCTCCGACGTTGCGTGGGGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGC
ACCA

シグナル配列 (1-57)、可変領域 (58-384)

配列番号54 : A201抗体軽鎖のアミノ酸配列

MSSAQFLGLLLLCFQGARC DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDIGNYLNWYQQ
KPDGTVKVLIIYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGHS LPP
TFGGG TKLEIKRADAAP

シグナル配列 (1-19)、可変領域 (20-128)

[図9]

配列番号56：A205抗体重鎖をコードするヌクレオチド配列

ATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTATTCCTGATGGCAGCTGCCCCAAAGTGCCCAAGC
ACAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTC
AAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACAGACTATTCAATGAACTGGGT
GAAGCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCTACACT
GGAGAGCCAAACATATGCTGATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAAC
CTCTGCCAGCACTGCCTATTTGCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACACGGCTA
CATATTTCTGTGCAAGCCCCATTTCAATTACTTCGGCTACTTGACTACTGGGGCCAAG
GCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACAACA

シグナル配列（1－57）、可変領域（58－414）

配列番号57：A205抗体重鎖のアミノ酸配列

MAVWVTLFLMAAAQSAQAQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSMNW
VKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLIKNE
DTATYFCASPISLLRLLDYWGQGTTTLTVSSAKTT

シグナル配列（1－19）、可変領域（20－138）

[図10]

配列番号58：A205抗体軽鎖をコードするヌクレオチド配列

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGTCTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGCAG
TGATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAG
CCTCCATCCCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTATT
TACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTT
TCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAG
ATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGC
TCTCAAAGTACACATGTTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA
ACGGGCTGATGCTGCACCA

シグナル配列（1－57）、可変領域（58－399）

配列番号59：A205抗体軽鎖のアミノ酸配列

MKLPVRLVLMFWIPASSDVMTQTPLSLPVSLGDQASIPCRSSQSLVHSNGNTYL
HWYLQKPGQSPKLLIYKVSINRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQ
STHVPWTFGGGTKLEIKRADAAP

シグナル配列（1－19）、可変領域（20－133）

[図11]

配列番号 60 : A201 抗体のCDRH1のアミノ酸配列
DTYVH

配列番号 61 : A201 抗体のCDRH2のアミノ酸配列
RIDPANANTKYDPKFQG

配列番号 62 : A201 抗体のCDRH3のアミノ酸配列
YGKSAWFAY

配列番号 63 : A201 抗体のCDRL1のアミノ酸配列
RASQDIGNYLN

配列番号 64 : A201 抗体のCDRL2のアミノ酸配列
YTSRLHS

配列番号 65 : A201 抗体のCDRL3のアミノ酸配列
QQGHSLPPT

[図12]

配列番号 66 : A205 抗体のCDRH1のアミノ酸配列
DYSMN

配列番号 67 : A205 抗体のCDRH2のアミノ酸配列
WINTYTGEPTYADDFKG

配列番号 68 : A205 抗体のCDRH3のアミノ酸配列
PISLLRLLDY

配列番号 69 : A205 抗体のCDRL1のアミノ酸配列
RSSQSLVHSNGNTYLH

配列番号 70 : A205 抗体のCDRL2のアミノ酸配列
KVSNRFS

配列番号 71 : A205 抗体のCDRL3のアミノ酸配列
SQSTHVPWT

[図13]

免疫染色における抗EPHA2抗体の性能の比較

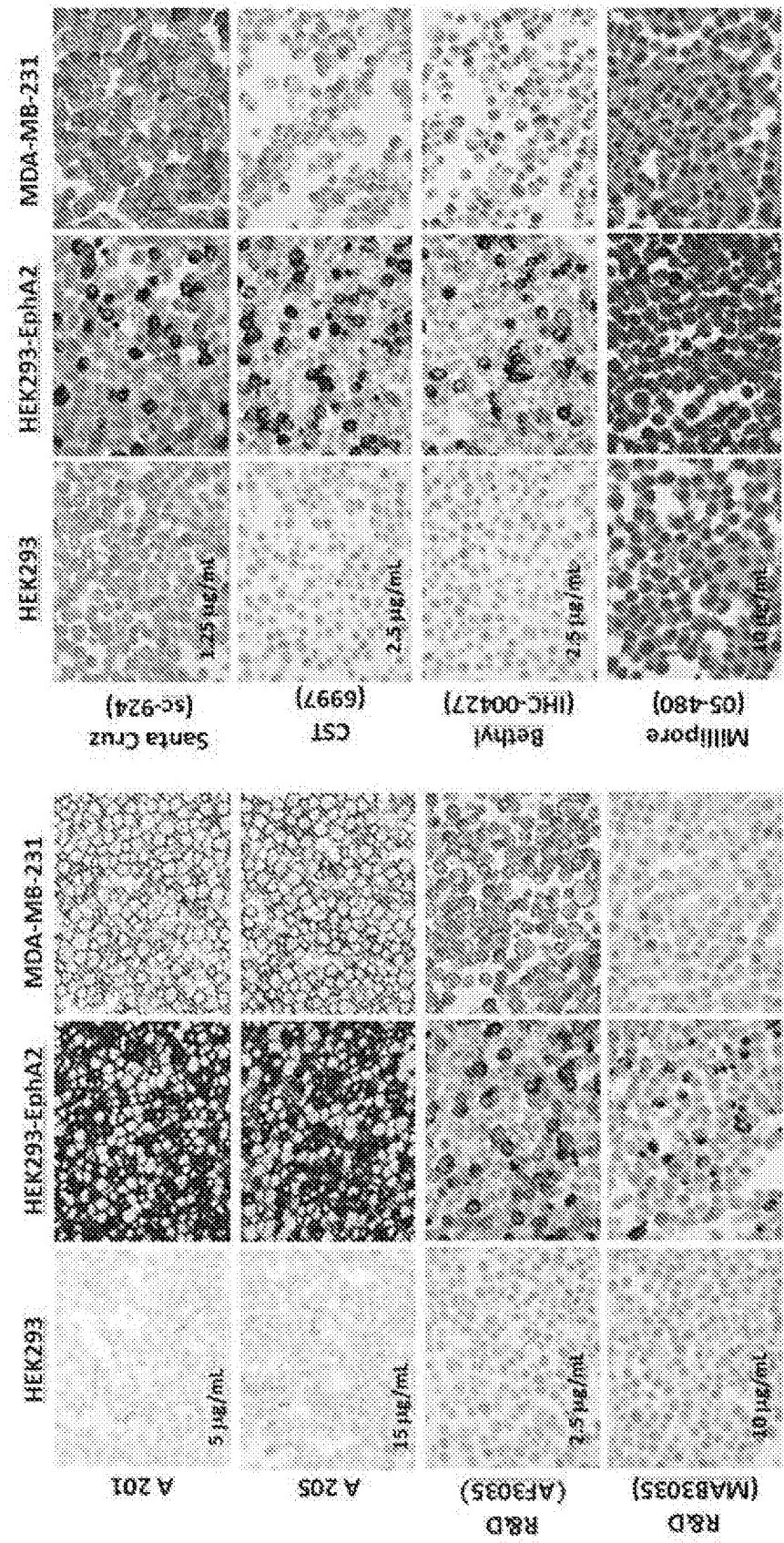
メーカー	型番	動物種	クローン	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	染色性		
					HEK293	HEK293 -EPHA2	MDA-MB- 231
Daiichi Sankyo	—	Mouse	A201	5	—	+	+
Daiichi Sankyo	—	Mouse	A205	15	—	+	+
R&D systems	AF3035	Goat	-	2.5	—	+	+
R&D systems	MAB3035	Mouse	371805	10	—	+	—
Santa Cruz	sc-924	Rabbit	-	1.25	—	+	±
CST	6997	Rabbit	D4A2	2.5	—	+	±
Bethyl Laboratories	IHC-00427	Rabbit	-	2.5	—	+	—
Millipore	05-480	Mouse	D4	10	—*	+	—*

CST: Cell Signaling Technology、

HEK293: EPHA2非発現HEK293 α 細胞、HEK293-EPHA2: EPHA2過剰発現HEK293 α 細胞

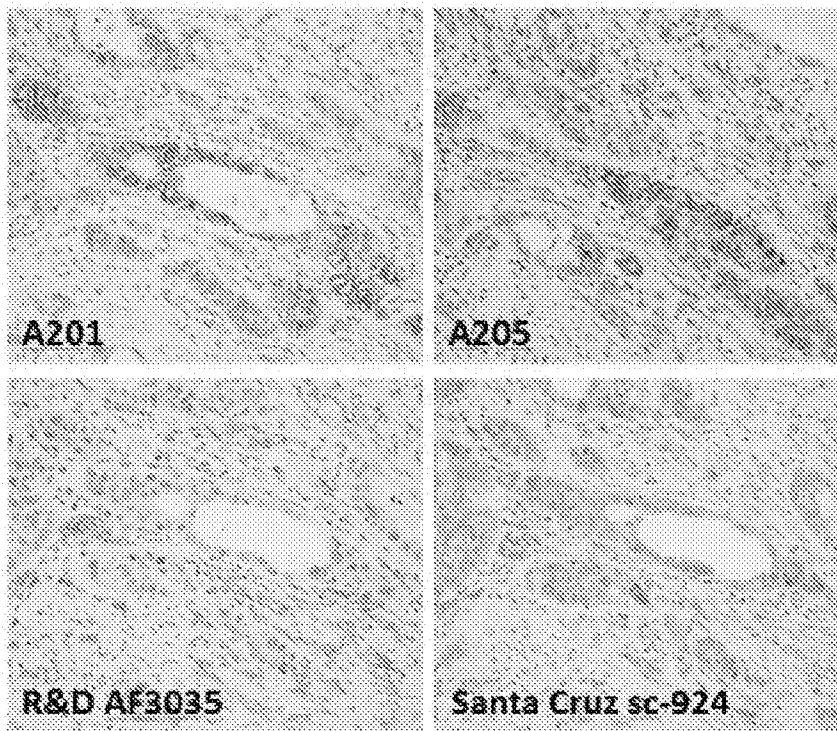
*極めて高い非特異染色あり

[図14]

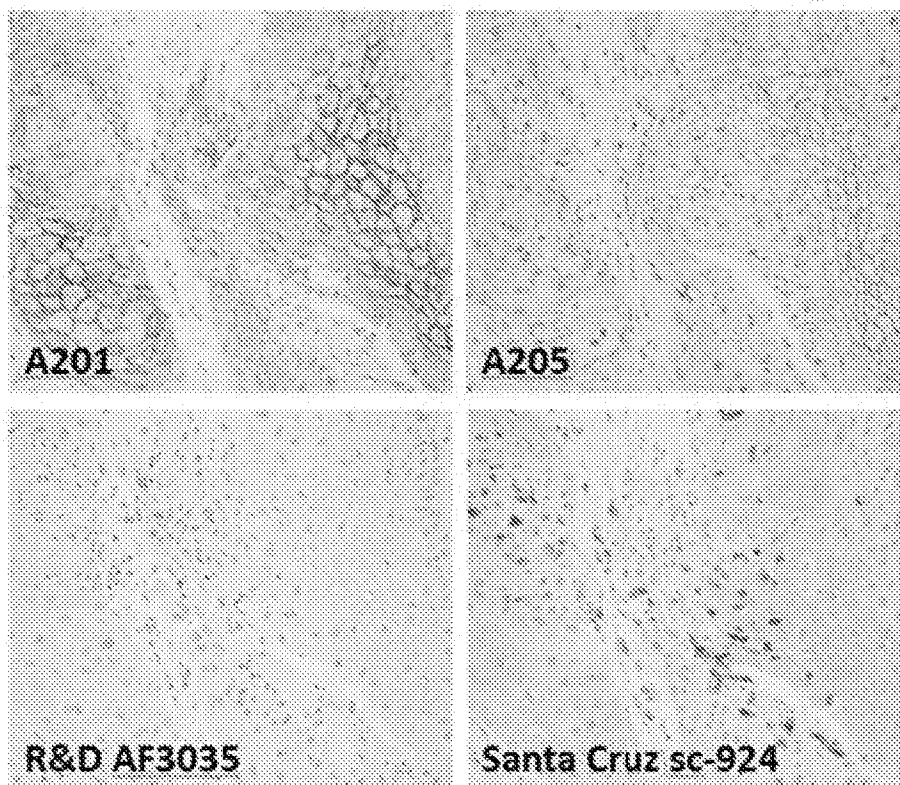


CST: Cell Signaling Technology、
HEK293 : EPHA2非発現HEK293α細胞、HEK293-EPHA2 : EPHA2過剰発現HEK293α細胞

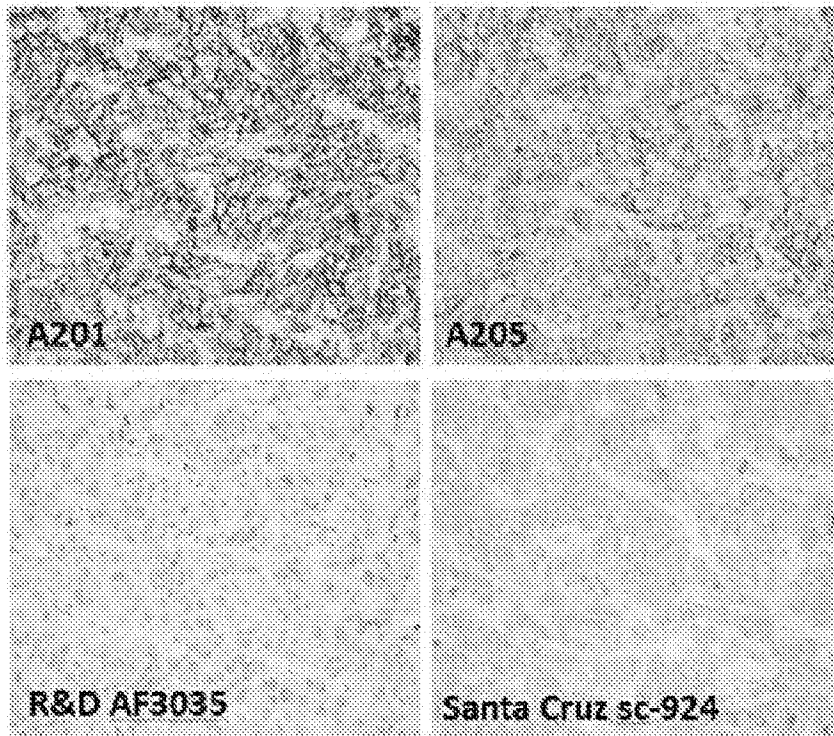
[図15]

抗EPHA2抗体による免疫染色：食道癌

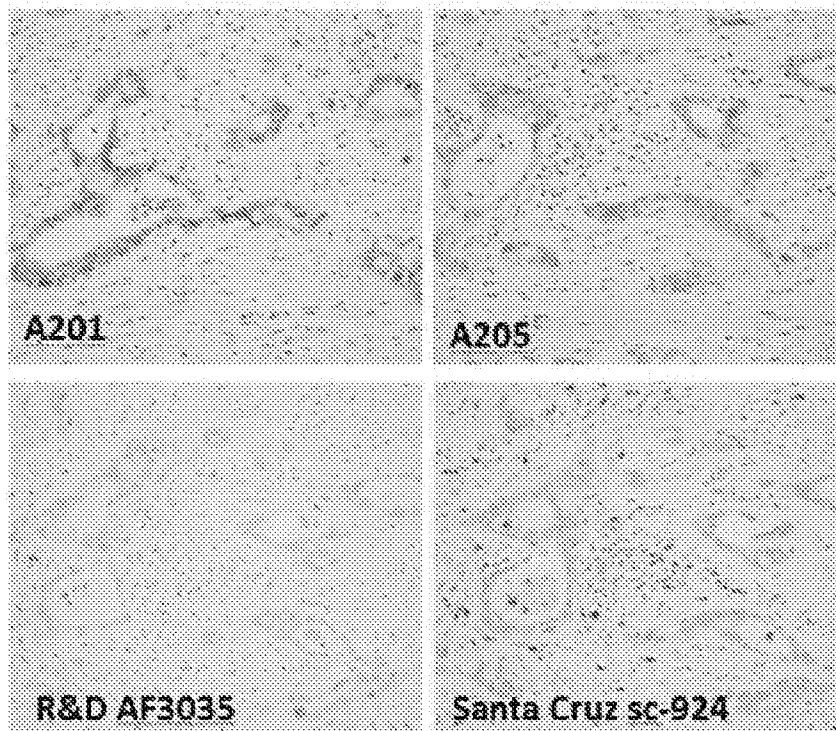
[図16]

抗EPHA2抗体による免疫染色：子宮頸癌

[図17]

抗EPHA2抗体による免疫染色：大腸癌

[図18]

抗EPHA2抗体による免疫染色：胃癌

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/062719

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/53(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)

C12N15/09, A61K39/395, A61P35/00, C07K16/28, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/08, G01N33/53

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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/008397 A1 (Daiichi Sankyo Co., Ltd.), 19 January 2012 (19.01.2012), claims; paragraphs [0097], [0098], [0114] & TW 201208701 A	16, 26
X	JP 2008-500021 A (Medimmune, Inc.), 10 January 2008 (10.01.2008), paragraphs [0023], [0024], [0048], [0049], [0052], [0054], [0093] to [0124], [0241] & US 2005/0152899 A1 paragraphs [0028], [0029], [0071], [0072], [0076], [0078], [0118] to [0152], [0298] & WO 2005/051307 A2 & EP 1689346 A & KR 10-2006-0135671 A & CN 1905899 A	1-28

☐ 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 another 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
06 July 2016 (06.07.16)

Date of mailing of the international search report
19 July 2016 (19.07.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. C12N15/09, A61K39/395, A61P35/00, C07K16/28, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/08, G01N33/53			
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			
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			
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)			
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)			
C. 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	WO 2012/008397 A1 (第一三共株式会社) 2012.01.19, 特許請求の範囲、並びに、[0097], [0098]及び[0114]段落 & TW 201208701 A	16, 26	
X	JP 2008-500021 A (メディミュン, インコーポレーテッド) 2008.01.10, 【0023】, 【0024】, 【0048】, 【0049】, 【0052】, 【0054】, 【0093】 - 【0124】 及び 【0241】 段落 & US 2005/0152899 A1, [0028], [0029], [0071], [0072], [0076], [0078], [0118]-[0152]及び[0298]段落	1-28	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「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 「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 「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) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「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 「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 「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 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 06.07.2016		国際調査報告の発送日 19.07.2016	
国際調査機関の名称及びあて先 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		特許庁審査官 (権限のある職員) 柴原 直司	4 N 3 5 3 4
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

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
	& WO 2005/051307 A2 & EP 1689346 A & KR 10-2006-0135671 A & CN 1905899 A	