

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6967523号
(P6967523)

(45) 発行日 令和3年11月17日 (2021. 11. 17)

(24) 登録日 令和3年10月27日 (2021. 10. 27)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/13 (2006. 01)	C 1 2 N 15/13 Z N A
C 1 2 P 21/08 (2006. 01)	C 1 2 P 21/08
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 14 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-548121 (P2018-548121)	(73) 特許権者	514070937
(86) (22) 出願日	平成29年3月10日 (2017. 3. 10)		メディシナル バイオコンバージェンス
(65) 公表番号	特表2019-514350 (P2019-514350A)		リサーチ センター
(43) 公表日	令和1年6月6日 (2019. 6. 6)		大韓民国 443-270 キョンギード
(86) 国際出願番号	PCT/KR2017/002631		スウォンシー ヨントング クァンギ
(87) 国際公開番号	W02017/155355		ョーロ 145 アドバンスド インステ
(87) 国際公開日	平成29年9月14日 (2017. 9. 14)		ィチューツ オブ コンバージェンス テ
審査請求日	令和2年3月10日 (2020. 3. 10)		クノロジー ビードン 8階 (イウイ
(31) 優先権主張番号	10-2016-0028809		ードン)
(32) 優先日	平成28年3月10日 (2016. 3. 10)	(73) 特許権者	514252784
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)		イファ ユニバーシティーインダストリー
			コラボレーション ファウンダーション
			大韓民国 120-750 ソウル ソデ
			ムング イファヨデーギル 52

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 A I M P 2 - D X 2 タンパク質に特異的に結合する抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 で表示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを抗原決定部 (epitope) として認識する、A I M P 2 タンパク質には結合せず、A I M P 2 - D X 2 に特異的に結合する抗体又は抗体の断片であって、

前記抗体又は抗体の断片は、配列番号 3 で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位 (C D R) 1、配列番号 5 で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 2、及び配列番号 7 で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域；及び配列番号 9 で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 1、配列番号 11 で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 2 及び配列番号 13 で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含むことを特徴とする前記抗体又は抗体の断片。

【請求項 2】

前記抗体又は抗体の断片は、配列番号 15 で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；及び配列番号 17 で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むことを特徴とする請求項 1 記載の抗体又は抗体の断片。

【請求項 3】

前記抗体は、配列番号 19 で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖；及び配列番号 21 で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含むことを特徴とする請求項 1 記載の抗体又は抗体の断片。

【請求項 4】

10

20

前記抗体は、I g G、I g A、I g M、I g E及びI g Dからなる群から選ばれることを特徴とする請求項1記載の抗体又は抗体の断片。

【請求項5】

前記抗体の断片は、ダイアボディ、F a b、F a b'、F (a b)₂、F (a b')₂、F v及びs c F vからなる群から選ばれることを特徴とする請求項1記載の抗体又は抗体の断片。

【請求項6】

請求項1乃至5のうちいずれか一項に記載の抗体又は抗体の断片を含むがん診断用組成物。

【請求項7】

前記がんは結腸がん、大腸がん、肺がん、肝臓がん、胃がん、食道がん、膵臓がん、胆嚢がん、腎臓がん、膀胱がん、前立腺がん、精巣がん、子宮頸部がん、子宮内膜がん、絨毛がん、卵巣がん、乳がん、甲状腺がん、脳がん、頭頸部がん、悪性黒色腫、リンパ腫、再生不良性貧血及び血液がんからなる群から選ばれることを特徴とする請求項6記載のがん診断用組成物。

【請求項8】

請求項1乃至5のうちいずれか一項に記載の抗体又は抗体の断片をコードするポリヌクレオチド。

【請求項9】

前記ポリヌクレオチドは、配列番号16又は配列番号18で表示される塩基配列を含むことを特徴とする請求項8記載のポリヌクレオチド。

【請求項10】

請求項8に記載のポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクター。

【請求項11】

請求項10に記載の組換え発現ベクターで形質転換された細胞。

【請求項12】

(a) 請求項10に記載の組換え発現ベクターで宿主細胞を形質転換する段階；

(b) 形質転換された宿主細胞を培養して抗体又は抗体の断片を生産する段階；及び

(c) 宿主細胞から生産された抗体又は抗体の断片を収得する段階を含む、A I M P 2タンパク質には結合せず、A I M P 2-D X 2に特異的に結合する抗体又はその断片を製造する方法であって、

前記抗体又は抗体の断片は、配列番号3で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位(C D R)1、配列番号5で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖C D R 2、及び配列番号7で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖C D R 3を含む重鎖可変領域；及び配列番号9で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖C D R 1、配列番号11で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖C D R 2及び配列番号13で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖C D R 3を含む軽鎖可変領域を含むことを特徴とする前記抗体又は抗体の断片を製造する方法。

【請求項13】

がん診断用製剤を製造するための請求項1乃至5のうちいずれか一項に記載の抗体又は抗体の断片の使用。

【請求項14】

(a) 個体(ヒトを除く)から生物学的試料を収得する段階；

(b) 請求項1乃至5のうちいずれか一項に記載の抗体又は抗体の断片を利用して、前記生物学的試料内のA I M P 2-D X 2タンパク質水準を測定する段階；及び

(c) 前記A I M P 2-D X 2タンパク質水準を、正常個体のA I M P 2-D X 2タンパク質水準と比較する段階を含む個体(ヒトを除く)のがん診断方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

本出願は、2016年3月10日に出願された韓国特許出願第10-2016-0028809号の優先権を主張し、前記明細書全体は本出願の参考文献である。

【0002】

本発明は、AIMP2-DX2タンパク質に特異的に結合する抗体に関するもので、より具体的には、配列番号1で表示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを抗原決定部(epitope)として認識する、AIMP2-DX2に特異的に結合する抗体又は抗体の断片、これを含むがん診断用組成物、前記抗体をコードするポリヌクレオチドと組換え発現ベクター、これを利用して形質転換された細胞及び前記抗体又は抗体の断片を製造する方法に関するものである。

【背景技術】

10

【0003】

AIMP2 (aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 2) は、アミノアシル-tRNA合成酵素(aminoacyl-tRNA synthetase、ARS)複合体の形成に関連したタンパク質の一つである。AIMP2は、タンパク質合成での本源的な機能以外にも、新規ながん抑制剤(tumor suppressor)として、Smad2/3との直接的な相互作用を通じてTGF- β の信号伝達を強化する機能があることが知られている。

【0004】

本発明者による韓国登録特許第10-0762995号公報により公知にされた通り、肺がん、肝臓がん、皮膚がん、乳がん、腎臓がん、骨肉腫などの多様ながん細胞株及び組織では、AIMP2のエキソン(exon)2が欠損された形態の変異体であるAIMP2-DX2が過発現されることが観察された。一方、正常細胞を形質転換してAIMP2-DX2を過発現するようにすれば、野生型(WT) AIMP2の水準が大幅に減少し、AIMP2が核に移動することを防ぐなど、AIMP2の活性が抑制され、c-mycの発現は増加し、細胞の成長は促進されるなど、TGF- β 信号の機能異常をもたらすことが分かった。これはAIMP2-DX2とがんの発生と進行との間に密接な関連性があることを示している。

20

【0005】

また、本発明者の他の韓国登録特許第10-1067816号公報では、AIMP2が、TRAF2との相互作用を通じてTNF- α の細胞死滅活性(apoptotic activity)を媒介し、この活性はAIMP2-DX2によって調節されることを初めて公開した。また、AIMP2-DX2は、炎症マーカーであるCOX-2の発現にも影響を与える点を究明して、AIMP2-DX2の活性を抑制することにより、炎症性疾患の治療効果を示すことを提示した。

30

【0006】

このようにAIMP2-DX2タンパク質が多様な疾患の誘発と進行に関連していることが究明されたことにより、AIMP2-DX2が新薬開発の新しい標的物質に擡頭してきている。従って、突然変異鎖AIMP2-DX2タンパク質を、野生型AIMP2と区別して正確に感知することができる試薬と診断方法に対する技術開発が必要な実情である。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】韓国登録特許第10-0762995号公報

【特許文献2】韓国登録特許第10-1067816号公報

【発明の概要】

【0008】

[発明の詳細な説明]

[技術的課題]

そこで、本発明者らは、ヒトのAIMP2-DX2からexon2が欠損した部位のe

50

x o n 1 と e x o n 3 の接合部分 (junction) について、F a b ファージライブラリ (phage library) をスクリーニングすることにより、野生型 A I M P 2 には結合せず、A I M P 2 - D X 2 にのみ特異的に結合する抗体を選別して、本発明を完成した。

【0009】

従って、本発明の目的は、
配列番号1で表示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを抗原決定部として認識する、
A I M P 2 - D X 2 に特異的に結合する抗体又は抗体の断片を提供するものである。

【0010】

本発明の他の目的は、
前記抗体又は抗体の断片を含むがん診断用組成物を提供するものである。

10

【0011】

本発明のさらに他の目的は、
前記抗体又は抗体の断片をコードするポリヌクレオチドを提供するものである。

【0012】

本発明のさらに他の目的は、
前記ポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターを提供するものである。

【0013】

本発明のさらに他の目的は、
前記組換え発現ベクターで形質転換された細胞を提供するものである。

20

【0014】

本発明のさらに他の目的は、
(a) 前記抗体又は抗体の断片をコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターで宿主細胞を形質転換する段階；
(b) 形質転換された宿主細胞を培養して抗体又は抗体の断片を生産する段階；及び
(c) 宿主細胞から生産された抗体又は抗体の断片を取得する段階を含む A I M P 2 - D X 2 に特異的に結合する抗体又はその断片を製造する方法を提供するものである。

【0015】

本発明のさらに他の目的は、
がん診断用製剤を製造するための前記抗体又は抗体の断片の使用を提供するものである。

【0016】

30

本発明のさらに他の目的は、
(a) 個体から生物学的試料を取得する段階；
(b) 前記抗体又は抗体の断片を利用して前記生物学的試料内の A I M P 2 - D X 2 タンパク質の水準を測定する段階；及び
(c) 前記 A I M P 2 - D X 2 タンパク質の水準を正常個体の A I M P 2 - D X 2 タンパク質の水準と比較する段階を含む個体のがんの診断方法を提供するものである。

【0017】

[技術的解決方法]

前記のような目的を達成するために本発明は、
配列番号1で表示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを抗原決定部として認識する、
A I M P 2 - D X 2 に特異的に結合する抗体又は抗体の断片を提供する。

40

【0018】

本発明の他の目的を達成するために本発明は、
前記抗体又は抗体の断片を含むがん診断用組成物を提供する。

【0019】

本発明のさらに他の目的を達成するために本発明は、
前記抗体または抗体の断片をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0020】

本発明のさらに他の目的を達成するために本発明は、
前記ポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターを提供する。

50

【0021】

本発明のさらに他の目的を達成するために本発明は、
前記組換え発現ベクターで形質転換された細胞を提供する。

【0022】

本発明のさらに他の目的を達成するために本発明は、
(a) 前記抗体又は抗体の断片をコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターで宿主細胞を形質転換する段階；
(b) 形質転換された宿主細胞を培養して抗体又は抗体の断片を生産する段階；及び
(c) 宿主細胞から生産された抗体又は抗体の断片を収得する段階を含む A I M P 2 - D X 2 に特異的に結合する抗体又はその断片を製造する方法を提供する。

10

【0023】

本発明のさらに他の目的を達成するために本発明は、
がん診断用製剤を製造するための前記抗体又は抗体の断片の使用を提供する。

【0024】

本発明のさらに他の目的を達成するために本発明は、
(a) 個体から生物学的試料を収得する段階；
(b) 前記抗体又は抗体の断片を利用して前記生物学的試料内の A I M P 2 - D X 2 タンパク質水準を測定する段階；及び
(c) 前記 A I M P 2 - D X 2 タンパク質水準を正常個体の A I M P 2 - D X 2 タンパク質水準と比較する段階を含む個体のがん診断方法を提供する。

20

【0025】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0026】

本発明は、配列番号1で表示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを抗原決定部として認識する、A I M P 2 - D X 2 に特異的に結合する抗体又は抗体の断片を提供する。

【0027】

本発明で“A I M P 2 - D X 2 ”とは、野生型(wild type、WT) A I M P 2 タンパク質からエキソン(exon)2の領域が欠失された変異体を意味する。前記 A I M P 2 タンパク質は、アミノアシル-tRNA合成酵素を含む複合体の形成に関与するタンパク質の一つで、p38、JTV-1、JTV1又はp38/JTV-1などと呼ばれることもあり、ヒトでは7番染色体上(7p22)のA I M P 2 遺伝子にコードされている。A I M P 2 タンパク質は312又は320個のアミノ酸からなるタンパク質で発見され、312aaタンパク質のアミノ酸配列は、Genbank accession number AAC50391.1又はGI:1215669、320aaタンパク質のアミノ酸配列は、Genbank accession number AAH13630.1又はGI:15489023などで公知にされており、文献にも記載されている(312aa version:Nicolaides, NC, Kinzler, KW and Vogelstein, B. Analysis of the 5' region of PMS2 reveals heterogeneous transcripts and a novel overlapping gene, Genomics29(2)、329-334(1995);320aa version:Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences, Proc.Natl.Acad.Sci.USA.99(26)、16899-16903(2002))。

30

40

【0028】

従って、本発明でA I M P 2 - D X 2 タンパク質は、前記312aa又は320aaのA I M P 2 タンパク質からexon2に該当するアミノ酸配列が欠損した変異体タンパク質を意味する。前記A I M P 2 - D X 2 タンパク質は、全体配列のA I M P 2 においてexon2の領域が欠失されたタンパク質、さらに、A I M P 2 タンパク質の等価物(アミノ酸配列の置換、欠失、挿入、またはこれらの組み合わせによる変形体としてA I M P 2 と実質的に同等の活性を有する機能的同等物、または物理化学的性質を増加または減少させる変形を持つがA I M P 2 と実質的に同等の活性を有する機能的誘導体)においてexon2の領域が欠失されたタンパク質を含む。また、A I M P 2 - D X 2 タンパク質は、

50

A I M P 2 タンパク質の e x o n 2 のアミノ酸配列が全て欠失したり、又は e x o n 2 のアミノ酸配列の一部が欠失されて A I M P 2 で e x o n 1 と e x o n 3 に該当するアミノ酸配列が、本発明に係る抗体によって認識される程度に近くに位置するタンパク質を意味し、さらに e x o n 1、e x o n 3、及び／又は e x o n 4 領域の一部が欠失したタンパク質も含まれる。好ましくは、本発明の A I M P 2 - D X 2 タンパク質は、A I M P 2 タンパク質の e x o n 2 領域が全て欠失したタンパク質、すなわち e x o n 2 によってコードされている 69 個のアミノ酸が全て欠失されて A I M P 2 の e x o n 1 の最後のアミノ酸と e x o n 3 の最初のアミノ酸が連結されているタンパク質である。

【0029】

本発明で“抗体 (antibody)”とは、免疫グロブリン (immunoglobulin、I g) とも呼ばれ、抗原に選択的に作用して、生体免疫に関与するタンパク質の総称である。自然の中で発見される全体抗体 (whole antibody) は、一般的に複数のドメインから成るポリペプチドである軽鎖 (light chain、L C) 及び重鎖 (heavy chain、H C) の 2 つの対からなり、これらの H C / L C の 2 つの対からなる構造を基本単位として構成されている。哺乳類の抗体を構成する重鎖の種類は、ギリシャ文字の α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及び μ で表示されている 5 つのタイプがあり、重鎖の種類によってそれぞれ I g A、I g D、I g E、I g G 及び I g M などの他の種類の抗体を構成することになる。哺乳類の抗体を構成する軽鎖の種類は λ 及び κ で表示される 2 つの種類が存在する。

【0030】

抗体の重鎖と軽鎖は、構造的にアミノ酸配列の変異性により可変領域と不変領域とに区分される。重鎖の不変領域は、抗体の種類によって C H 1、C H 2、及び C H 3 (I g A、I g D、及び I g G 抗体) 及び C H 4 (I g E 及び I g M 抗体) など、3 又は 4 つの重鎖不変領域で構成されており、軽鎖は 1 つの不変領域である C L で構成されている。重鎖と軽鎖の可変領域は、それぞれ重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のいずれかのドメインで構成されている。軽鎖と重鎖はそれぞれの可変領域と不変領域が並んで配置され、1 つの共有二硫化結合 (ジスルフィド結合; disulfide bond) により連結され、軽鎖と結合した二分子の重鎖は、2 つの共有二硫化結合を通じて連結され、全体抗体の形態を形成する。全体抗体は、重鎖及び軽鎖の可変領域を通じて抗原に特異的に結合し、全体の抗体は、2 つの重鎖及び軽鎖の対 (H C / L C) で構成されているので、一つの分子の全体の抗体は、二つの可変領域を通じて同じ 2 つの抗原に結合する 2 価の単一特異性を有するようになる。抗原に結合する抗体可変領域を、抗体の抗原結合部位 (antigen-binding site) と称し、抗原の表面で抗体により認識される部分を抗原決定部 (epitope) と称する。

【0031】

抗原結合部位が含まれている抗体の可変領域は、配列の変異性が少ない骨組み部位 (フレームワーク領域; framework region、F R) と、配列変異性が高い超可変性部位 (高頻度可変領域; hypervariable region) の相補性決定部位 (相補性決定領域; complementary determining region、C D R) とに細分される。V H と V L は、それぞれ 3 つの C D R 及び 4 つの F R が、N-末端から C-末端の方向に、F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4 の順に配列されている。抗体の可変領域の中でも、配列変異性が最も高い C D R が抗原と直接結合する部位であり、抗体の抗原特異性に最も重要である。

【0032】

本発明に係る抗体は、A I M P 2 - D X 2 変異体タンパク質に特異的に結合する抗体又は抗体の断片であって、配列番号 1 で表示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを抗原決定部として認識することの特徴とする。前記配列番号 1 で表示されるアミノ酸配列 (以下、本明細書では、A I M P 2 - D X 2 抗原ペプチドと呼ぶ) は、A I M P 2 - D X 2 タンパク質から e x o n 2 が全て欠失された A I M P 2 - D X 2 タンパク質において、e x o n 1 と e x o n 3 が接合された部位の 11 個のアミノ酸の配列であって、アミノ酸配列では G H V Q D Y G A L K D である。N-末端の配列 G H V Q は、e x o n 1 に該当し、C-末端の配列 D Y G A L K D は e x o n 3 に該当する (図 1 の B 参照)。配列番号 1 の

アミノ酸配列は exon 2 が欠損していない野生型の A I M P 2 タンパク質には存在しないので、配列番号 1 を抗原決定部として認識する抗体又は抗体の断片は、野生型 A I M P 2 タンパク質には結合せず、A I M P 2 - D X 2 変異体タンパク質にのみ特異的に結合する抗体又はその断片であることが分る。

【0033】

本発明者らは、前記配列番号 1 のアミノ酸配列を抗原決定部として認識して、A I M P 2 - D X 2 変異体タンパク質に特異的に結合する抗体を開発するために、ファージ提示（ファージディスプレイ；phage-displayed）F a b ライブラリをスクリーニングした。配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドに、担体タンパク質を簡単に接合するためのシステイン（Cys）アミノ酸を C - 末端に追加し、担体タンパク質のキーホールリンペットヘモシアニン（keyhole limpet hemocyanin）を接合して、ウサギに注入して、免疫反応を誘導した。免疫反応を起こしたウサギの脾臓から抽出した mRNA から、ウサギ抗体の可変領域に該当する c D N A を合成し、ヒトの F a b の抗体不変領域をコードする D N A を連結して、ファージディスプレイに使用される p C o m b 3 X T T ベクターに挿入した。前記ウサギ／ヒトのキメラ F a b をコードするベクターで大腸菌（E R 2 5 3 7）を形質転換して、ヘルパーファージ（helper phage）を用いて感染させて製作した F a b ライブラリを A I M P 2 - D X 2 タンパク質に対してパニングして、A I M P 2 - D X 2 タンパク質に結合するクローンを選別した。

10

【0034】

本発明者らは、抗原吸着（antigen preadsorption）、s i R N A を利用した抗原の発現抑制などの実験を通じて、前記 F a b ライブラリスクリーニングで選別された H 5 抗体と抗体の断片（F a b）が、A I M P 2 - D X 2 変異体タンパク質に特異的に結合することを確認した。H 5 抗体と A I M P 2 - D X 2 変異体間の結合は、A I M P 2 - D X 2 変異体タンパク質の溶解性に影響を及ぼす N - 末端アミノ酸欠損形態にも影響を受けない。特に、本発明に係る抗体は、野生型の A I M P 2 タンパク質には全く結合せず、A I M P 2 - D X 2 タンパク質にのみ結合して、A I M P 2 - D X 2 変異体タンパク質を選択的に感知するのに極めて効果的である。

20

【0035】

本発明に係る抗体又は抗体の断片は、好ましくは、配列番号 3 で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位（C D R）1、配列番号 5 で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 2、及び配列番号 7 で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域；及び配列番号 9 で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 1、配列番号 11 で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 2、及び配列番号 13 で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含むことを特徴とするものでもある。

30

【0036】

また、本発明に係る抗体又は抗体の断片は、好ましくは、配列番号 3 で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位（C D R）1、配列番号 5 で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 2 及び配列番号 7 で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域；及び配列番号 9 で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 1、配列番号 11 で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 2、及び配列番号 13 で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域からなることを特徴とするものでもある。

40

【0037】

また、本発明に係る抗体又は抗体の断片は、本質的に、好ましくは配列番号 3 で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定部位（C D R）1、配列番号 5 で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 2 及び配列番号 7 で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変領域；及び配列番号 9 で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 1、配列番号 11 で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 2、及び配列番号 13 で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変領域からなることを特徴とするものでもある。

50

【0038】

また、本発明に係る抗体又は抗体の断片は、前記の重鎖と軽鎖のCDRの構成を含み、配列番号15で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）；及び配列番号17で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含むことを特徴とするものでもある。

【0039】

また、本発明に係る抗体又は抗体の断片は、前記の重鎖と軽鎖のCDRの構成を含み、配列番号15で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；及び配列番号17で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域からなることを特徴とするものでもある。

【0040】

また、本発明に係る抗体又は抗体の断片は、本質的に、前記の重鎖と軽鎖のCDRの構成を含み、配列番号15で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）；及び配列番号17で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（VL）からなることを特徴とするものでもある。

【0041】

前記本発明に係る抗体は、配列番号19で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖；及び配列番号21で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含むことを特徴とする抗体でもある。

【0042】

また、本発明に係る抗体は、配列番号19で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖；及び配列番号21で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖からなることを特徴とする抗体でもある。

【0043】

また、本発明に係る抗体は、本質的に、配列番号19で表示されるアミノ酸配列を含む重鎖；及び配列番号21で表示されるアミノ酸配列を含む軽鎖からなることを特徴とする抗体でもある。

【0044】

本発明に係る抗体又は抗体の断片は、前記のCDR、VHとVL、又は軽鎖と重鎖の構成を有するものであれば、その種類に制限はなく、抗体はIgG、IgA、IgM、IgE、又はIgD形態の抗体でもある。好ましくは、IgG形態の抗体でもある。

【0045】

また、本発明において、抗体の断片は、AIMP2-DX2抗原に特異的な結合力を維持している抗体の断片を意味し、具体的には、Fab、F(ab)₂、Fab'、F(ab')₂、Fv、ダイアボディ（二重特異性抗体；diabody）、scFvなどの形態でもある。Fab（抗原結合性フラグメント；fragment antigen-binding）は、抗体の抗原結合断片であって、重鎖と軽鎖それぞれの一つの可変領域と不変領域で構成されている。F(ab')₂は、抗体をペプシンで加水分解させて生成される断片であって、二つのFabが重鎖ヒンジ（hinge）で二硫化結合（disulfide bond）で連結された形態をなしている。F(ab')は、F(ab')₂断片の二硫化結合を還元して分離させた、Fabに重鎖ヒンジが付加された形態の単量体抗体断片である。Fv（variable fragment）は、重鎖と軽鎖それぞれの可変領域でのみ構成される抗体断片である。scFv（single chain variable fragment）は、VHとVLが柔軟なペプチドリンカーで連結されている組換え抗体断片である。ダイアボディは、scFvのVHとVLが極めて短いリンカーで連結されて互いに結合できず、同じ形態の他のscFvのVLとVHとそれぞれ結合して二量体を形成している形態の断片を意味する。

【0046】

また、本発明に係る抗体は、単一のB細胞から由来する単クローン（モノクローナル；monoclonal）抗体でもあって、複数のB細胞から由来する多クローン（ポリクローナル；polyclonal）抗体でもあって、抗体の重鎖と軽鎖のアミノ酸配列が実質的に同一な抗体の集団である単クローン抗体であることが望ましい。本発明に係る抗体又は抗体の断片は、ヒトを含む哺乳動物、鳥類などを含む任意の動物から由来したものでもあって、異種

10

20

30

40

50

の抗体配列を一緒に有しているキメラ (chimera) 抗体又は抗体の断片でもある。本発明の抗体又はその断片は、酵素、蛍光物質、放射性物質及びタンパク質などと接合されたものでもあるが、これに限定はされない。

【0047】

また、本発明は、本発明に係る抗体又は抗体の断片を含むがん診断用組成物を提供する。

【0048】

AIMP2-DX2 変異体タンパク質は、多様な種類のがんから過剰発現されており、がんの発生と進行に密接に関連していることが知られている。本発明者らが明らかにしたところによると (韓国登録特許第10-0762995号)、肺がん、肝臓がん、皮膚がん、乳がん、腎臓がん、骨肉腫など多様な種類のがん細胞株及びがん組織では、AIMP2-DX2 が特異的に過剰発現される。AIMP2-DX2 が過剰発現されると、がん抑制因子の機能を有する野生型 AIMP2 の水準が劇的に減少し、核への移動が抑制されるなど、活性が低下する。また、過剰発現された AIMP2-DX2 は、c-myc の発現を増加させ、AIMP2 が核に移動することを防止して、TGF- β 信号の機能異常をきたすなど、AIMP2-DX2 の発現水準とがんの発生と進行の間に密接な関連性がある。従って、AIMP2-DX2 の異常発現又は異常過剰発現を感知することにより、がんを診断できることが分る。

【0049】

本発明に係るがん診断用組成物は、AIMP2-DX2 を異常発現又は過剰発現するがんであれば制限なく診断対象になれる。例えば、結腸がん、大腸がん、肺がん、肝臓がん、胃がん、食道がん、膵臓がん、胆嚢がん、腎臓がん、膀胱がん、前立腺がん、精巣がん、子宮頸がん、子宮内膜がん、絨毛がん、卵巣がん、乳がん、甲状腺がん、脳腫瘍、頭頸部がん、悪性黒色腫、リンパ腫、再生不良性貧血や血液がんなどを診断対象とすることができ、好ましくは乳がん、大腸がん、結腸がん、肺がん、肝臓がん、皮膚がん、腎臓がん、骨肉腫などを診断するために使用することができる。また、本発明に係るがん診断用組成物は、本発明に係る抗体又は抗体の断片のほかに、二次抗体、二次抗体の発色反応のための基質、補助因子などの抗体でタンパク質を感知するために通常使用される要素をさらに含むことができる。

【0050】

また、本発明は、本発明に係る抗体又は抗体の断片をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0051】

具体的には、前記ポリヌクレオチドは、本発明に係る抗体の重鎖可変領域をコードする配列番号16又は軽鎖可変領域をコードする配列番号18で表示される塩基配列を含むことを特徴とするポリヌクレオチドでもある。

【0052】

また、本発明は、本発明に係る抗体又は抗体の断片をコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターを提供する。

【0053】

本発明で“組換え (recombinant)”は“遺伝子操作 (manipulation)”と互換して使用することができ、遺伝子に変形を加えて切る、連結するなど分子的クローニング (molecular cloning) 実験技法を利用して、自然の状態では存在しない形態の遺伝子を製造することを意味する。本発明で“発現 (expression)”とは、細胞からタンパク質又は核酸が生成されることを意味する。

【0054】

本発明で“組換え発現ベクター”とは、適切な宿主細胞 (host cell) から、目的とするタンパク質又は核酸を発現することができるベクターとして、ポリヌクレオチド (遺伝子) 挿入物が発現されるように動作可能に連結された必須的な調整要素を含む遺伝子作製物を意味する。“動作可能に接続された (operably linked)”とは、一般的な機能を遂

10

20

30

40

50

行するように核酸発現調節配列と目的とするタンパク質又はRNAをコードする核酸配列が機能的に連結 (functional linkage) されているもので、発現調節配列によって遺伝子が発現されるように連結されたことを意味する。前記“発現調節配列 (expression control sequence)”とは、特定の宿主細胞において動作可能に連結されたポリヌクレオチド配列の発現を調節するDNA配列を意味する。そのような調節配列は、転写を実施するためのプロモーター、転写を調節するための任意のオペレーター配列、適切なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、転写及び解読の終結を調節する配列、開始コドン、終止コドン、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーなどを含む。

【0055】

本発明の組換え発現ベクターは、クローニングと抗体の製造分野で通常的に使用されるベクターであれば、その種類は特に制限されず、その例としては、プラスミドベクター、コスミドベクター、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らに限定されない。前記プラスミドは、大腸菌由来のプラスミド (pBR322、pBR325、pUC118及びpUC119、pET-22b (+))、バチルスサブチリス由来のプラスミド (pUB110及びpTP5) 及び酵母由来のプラスミド (YEp13、YEp24及びYCp50) などがあり、前記ウイルスはレトロウイルス、アデノウイルス、又はワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスなどが使用できる。ファージ表示などに通常的に使用されるpComb3系列のベクターを使用することもでき、抗体を哺乳類細胞で発現するために、哺乳類細胞でタンパク質を発現するために通常的に使用されるベクターは、例えば、pcDNAやpVITROなどのベクターを使用することができる。

【0056】

また、本発明は、本発明に係る抗体又は抗体の断片をコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターで形質転換された細胞を提供する。

【0057】

本発明の細胞は、本発明の組換え発現ベクターに含まれた抗体又はその断片をコードするポリヌクレオチドを発現するために使用することができる細胞であれば、その種類は特に制限されない。本発明に係る組換え発現ベクターで形質転換された細胞 (宿主細胞) は、原核生物 (例えば、大腸菌)、真核生物 (例えば、酵母または他の菌類)、植物細胞 (例えば、タバコまたはトマト植物の細胞)、動物細胞 (例えば、ヒト細胞、サル細胞、ハムスター細胞 (hamster cell)、ラット (rat cell) 細胞、マウス (mouse) 細胞)、ハムスター細胞、ラット細胞、マウス細胞、昆虫細胞、又はこれらに由来するハイブリドーマでもある。好ましくは、ヒトを含む哺乳類から由来した細胞でもある。例えば、HEK293T、293F細胞などを利用することができる。

【0058】

本発明に係る抗体又は抗体の断片のポリペプチドを発現することができる組換え発現ベクターは、当業界に公知された方法、例えば、これに限定はされないが、一時的形質感染 (transient transfection)、微細注射、形質導入 (transduction)、細胞融合、カルシウムホスフェート沈殿法、リボソーム媒介された形質感染 (liposome-mediated transfection)、DEAEデキストラン媒介された形質感染 (DEAE Dextran-mediated transfection)、ポリブレン媒介された形質感染 (polybrene-mediated transfection)、電気穿孔法 (electroporation)、遺伝子銃 (gene gun) 及び細胞内に核酸を流入させるための公知の方法により抗体又はその断片を生産するための細胞内部に導入して形質転換することができる。前記本発明に係る組換え発現ベクターで形質転換された細胞は、本発明に係る抗体の重鎖、軽鎖、又は抗体の断片を生産することになる。

【0059】

また、本発明は、

(a) 本発明による抗体又は抗体の断片をコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターで、宿主細胞を形質転換する段階；

(b) 形質転換された宿主細胞を培養して、抗体又は抗体の断片を生産する段階；及び

(c) 宿主細胞から生産された抗体又は抗体の断片を取得する段階を含むA I M P 2 - D X 2 に特異的に結合する抗体又はその断片を製造する方法を提供する。

【0060】

(a) 段階は、本発明による抗体又はその断片を生産するための宿主細胞を、前記の抗体又はその断片をコードするポリヌクレオチドが動作可能に連結された組換え発現ベクターで形質転換する段階である。

【0061】

通常の技術者は、選択された宿主細胞と組換え発現ベクターの種類により、前述した通り、適切な形質転換方法を選択して本段階を実施することができる。重鎖と軽鎖の塩基配列を含む組換え発現ベクターは、同じ宿主細胞に共同形質転換して重鎖と軽鎖が一つの細胞から発現するようにすることもでき、重鎖と軽鎖の塩基配列を含む組換え発現ベクターをそれぞれ個別の宿主細胞に形質転換して重鎖と軽鎖が別に発現するようにすることもできる。

【0062】

(b) 段階は前記形質転換された宿主細胞を培養して宿主細胞に導入された組換え発現ベクターから、本発明に係る抗体の重鎖と軽鎖又は抗体の断片のポリペプチドが生産できるようにする段階である。

【0063】

通常の技術者は、選ばれた宿主細胞を培養するための培地組成と培養条件、培養時間などを適切に選ぶことができる。宿主細胞から生産される抗体分子は、細胞の細胞質内に蓄積されるか、適切な信号伝達配列により細胞外部若しくは培養培地に分泌されるか、又はペリプラズムなどで標的化(targeted)されるようにすることができる。また、本発明による抗体がA I M P 2 - D X 2 に対する結合特異性を維持するように、当業界で公知の方法を利用してタンパク質をリフォールディング(再折りたたみ; refolding)させて、機能性構造(コンフォメーション; conformation)を有するようにすることが好ましい。またI g G形態の抗体を生産する場合、重鎖と軽鎖は別の細胞から発現させて、別の段階で重鎖と軽鎖を接触させて完全な抗体を構成するように製造することもできて、重鎖と軽鎖を同じ細胞から発現するようにして細胞内部で完全な抗体を形成することもできる。

【0064】

(c) 段階は宿主細胞から生産された抗体又はその断片を取得する段階である。

【0065】

宿主細胞から生産された抗体又はその断片ポリペプチドの特性、宿主細胞の特性、発現方式又はポリペプチドの標的化可否などを考慮して、通常の技術者は、取得方法を適切に選択及び調節することができる。例えば、培養培地に分泌された抗体又はその断片は、宿主細胞を培養した培地を取得し、遠心分離して不純物を除去するなどの方法で抗体を回収することができる。必要により細胞内特定小器官や、細胞質に存在する抗体を細胞外部に放出して回収するために、抗体又はその断片の機能的構造に影響を及ぼさない範囲で細胞を溶解させることもできる。また、取得した抗体は、クロマトグラフィー、フィルターなどによる濾過、透析などの方法を通じて不純物を除去して濃縮する過程を追加して経ることができる。

【0066】

本発明はがん診断用製剤を製造するための前記抗体又は抗体の断片の使用を提供する。

【0067】

本発明は

(a) 個体から生物学的試料を取得する段階;

(b) 前記抗体又は抗体の断片を利用して前記生物学的試料内のA I M P 2 - D X 2 タンパク質水準を測定する段階; 及び

(c) 前記A I M P 2 - D X 2 タンパク質水準を正常個体のA I M P 2 - D X 2 タンパク質水準と比較する個体のがん診断方法を提供する。

【0068】

本発明の前記“生物学的試料”には、血液及び生物学的起源のその他の液状試料、生検標本、組織培養のような固形組織試料又はこれらから由来した細胞が含まれる。より具体的には、例えば、これらに限定はされないが、組織、抽出物、細胞溶解物、全血、血漿、血清、唾液、眼球液、脳脊髄液、汗、尿、乳、腹水液、滑液、腹膜液などでもある。前記試料は、動物、好ましくは哺乳動物から取得することもでき、最も好ましくは、ヒトから得ることができる。前記試料は検出に使用する前に前処理することができる。例えば、濾過、蒸留、抽出、濃縮、妨害成分の不活性化、試薬の添加などを含むことができる。また、前記試料から核酸及びタンパク質を分離して検出に使用することができる。

【0069】

本発明の前記“個体”とは、動物、好ましくは哺乳動物、特にヒトを含む動物でもあって、動物から由来した細胞、組織、器官等でもある。前記個体は前記効果が必要な患者 (patient) でもある。

【0070】

本発明の診断方法は、正常個体の生物学的試料内 A I M P 2 - D X 2 タンパク質の水準を、がんが疑われる個体の生物学的試料内のタンパク質水準と比較することにより、実際の疾患発症可否を診断することができる。つまり、がんと推定される個体の生物学的試料から、本発明の前記抗体又はその断片を利用して A I M P 2 - D X 2 タンパク質の水準を測定し、正常個体の生物学的試料から、本発明の抗体又はその断片を利用して A I M P 2 - D X 2 タンパク質水準を測定して、両者を比較した後、疾患が疑われる個体の A I M P 2 - D X 2 タンパク質の水準が正常個体のものより異常発現又は異常過発現の場合、これを該当疾患に診断することができる。従って、前記診断方法は、“(d) 正常個体の A I M P 2 - D X 2 タンパク質の水準より異常発現又は異常過発現の場合、がんが発症したと判定する段階”をさらに含むことができる。これに関連して前述した通り体液内 A I M P 2 - D X 2 の水準は、特に肺がん、肝臓がん、皮膚がん、乳がん、腎臓がん、骨肉腫などの多様ながん細胞株及び組織で増加していることが報告されていることに基づく。がんについては前述した通りである。

【0071】

前記診断方法は、A I M P 2 - D X 2 タンパク質と本発明の抗体又はその断片との特異的抗原-抗体反応を通じて達成されるものであって、前記反応によって生成される抗原-抗体複合体の生成量は、検出ラベル (detection label) のシグナルの大きさを通じて定量的に測定可能である。本発明において、用語“抗原-抗体複合体”とは、A I M P 2 - D X 2 タンパク質とこれに特異的な本発明の抗体及びその断片との結合物を意味する。

【0072】

前記検出ラベル (標識) は、酵素、蛍光物、リガンド、発光物、微小粒子 (microparticle)、レドックス分子及び放射性同位元素からなるグループの中から選択することができ、必ずしもこれに制限されるものではない。検出ラベルとして酵素が使用される場合、利用可能な酵素には、 β -グルクロニダーゼ、 β -D-グルコシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、ペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコースオキシダーゼ、ヘキソキナーゼと G D P a s e、R N a s e、グルコースオキシダーゼとルシフェラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、ホスホエノルピールベイトカルボキシラーゼ (ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、ホスフェノールピールベイトデカボキシラーゼ (ホスホフェノールピルビン酸デカルボキシラーゼ)、 β -ラクタマーゼなどがあり、これに限定されない。蛍光物には、フルオレシン、イソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルデヒド、フルオレスカミンなどがあり、これに限定されない。リガンドには、ビオチン誘導体などがあり、これに限定されない。発光物には、アクリジニウムエステル、ルシフェリン、ルシフェラーゼなどがあり、これに限定されない。微小粒子には、コロイド金、着色されたラテックスなどがあり、これに限定されない。レドックス分子にはフェロセン、ルテニウム錯化合物、ピオローゲン、キノン、T i イオン、C s イオン、ジイミド、1, 4-ベンゾキノン、ハイ

10

20

30

40

50

ドロキノン、 $K_4W(CN)_8$ 、 $[Os(bpy)_3]^{2+}$ 、 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 、 $[Mo(CN)_8]^{4-}$ などが含まれ、これに限定されない。放射線同位元素には、 3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl 、 ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re などが含まれ、これに制限されない。

【0073】

タンパク質の水準を測定するための分析方法としては、ウェスタンブロット、ELISA、放射線免疫分析、放射免疫拡散法、オクタロニー免疫拡散法、ロケット免疫電気泳動、組織免疫染色（immunohistochemistry）、免疫沈殿分析法、補体固定分析法、FACS、タンパク質チップなどがあるが、これに制限されるものではない。前記分析方法を通じて、正常対照群での抗原抗体複合体の形成量とがんが疑われる患者での抗原抗体複合体の形成量を比較することができ、AIMP2-DX2生成量の増加の可否などの異常発現又は異常過発現を判断して、疾病が疑われる患者の実際のがん発症の可否を診断することができる。

10

【0074】

本発明の用語“～を含む”とは、“含有する”又は“特徴とする”と同意で使用され、組成物又は方法において、記載されていない追加的な成分要素又は方法段階などを排除しない。用語“～からなる（consisting of）”とは、別に記載されていない追加的な要素、段階又は成分などを除外することを意味する。用語“本質的に～からなる（essentially consisting of）”とは、組成物又は方法の範囲において、記載された成分の要素又は段階と共に、この基本的な特性に実質的に影響を及ぼさない成分要素又は段階などを含むことを意味する。

20

【0075】

[有利な効果]

従って、本発明は、AIMP2-DX2タンパク質に特異的に結合する抗体又は抗体の断片、これを含むがん診断用組成物、さらに、前記抗体をコードするポリヌクレオチドと組換え発現ベクター、これを利用して形質転換された細胞及び前記抗体又は抗体の断片を製造する方法を提供する。本発明で提供する抗体と抗体の断片は、野生型AIMP2には反応せず、exon2が欠損したAIMP2-DX2突然変異タンパク質に特異的に結合するため、がん、炎症性疾患など多様な病理に関連しているAIMP2-DX2タンパク質の存在と発現程度を確認するのに効果的である。

30

【図面の簡単な説明】

【0076】

【図1A】図1は、H5 FabのAIMP2-DX2抗原ペプチドに対する結合特異性を確認するための実験を示す。図1のAは、肺がん細胞株であるH460細胞溶解物を、抗原ペプチド（epitope peptide、 $100\mu g/ml$ ）存在下で、H5 Fab（“+”で表示）、又は抗原ペプチドを添加していない状態で、H5 Fab（“-”で表示）で感知したウェスタンブロットの結果である。

【図1B】図1は、H5 FabのAIMP2-DX2抗原ペプチドに対する結合特異性を確認するための実験を示す。図1のBは、野生型AIMP2においてexon2が欠損したAIMP2-DX2のアミノ酸配列について、H5抗体の選別に使用した抗原ペプチドに該当する部分を示す（下線の部分、アミノ酸配列GHVQDYGALKD）。exon1、exon3、exon4はそれぞれ灰色、緑色、黒色で表示されている。

40

【図2A】図2は、H5 FabとN-末端が欠損したAIMP2-DX2タンパク質の結合を確認するための実験を示す。図2のAは、多様な形態のAIMP2-DX2タンパク質を発現するように形質転換されたHEK293T細胞溶解物を、抗原ペプチド（epitope peptide、 $100\mu g/ml$ ）存在下で、H5 Fab（“H5+epitope peptide”）、又は抗原ペプチドがない状態でH5 Fab（“H5”）を利用して感知したウェスタンブロットの結果である。HEK293T細胞で発現されたAIMP2-DX2タンパク質は、streptagに接合されており、全体の長さのタンパク質（F-DX2、“F”）であるか又は、N-末端アミノ酸が欠損した形態のタンパク質

50

(“△2”、アミノ酸2個欠損、△2-DX2；“△23”、アミノ酸23個欠損、△23-DX2；“△33”、アミノ酸33個欠損、△33-DX2)である。この結果は、H5 Fabがepitopeを含む多様な形態のMP2-DX2を認識することを示している。“EV”は空のベクター(empty vector)を意味する。

【図2B】図2は、H5 FabとN-末端が欠損したAIMP2-DX2タンパク質の結合を確認するための実験を示す。図2のBは、前記AIMP2-DX2タンパク質の模式図(exon1、exon3、exon4はそれぞれグレー、緑、黒で表示；streptagはオレンジ色で表示、リンカーを含む30個のアミノ酸で構成される)と、AIMP2-DX2アミノ酸配列での該当する部分を示す(黒い矢印と赤で表示されたアミノ酸)。

10

【図3A】図3は、H5 FabのAIMP2-DX2抗原に対する結合特異性を確認するための実験を示す。図3のAは、AIMP2-DX2のsiRNA(sidx2、“DX2”；si exon4 #1、“#1”、si exon4 #2、“#2”)で形質転換されて、72時間培養したH460細胞の溶解物とH5 Fabを利用したウェスタンブロットの結果である。

【図3B】図3は、H5 FabのAIMP2-DX2抗原に対する結合特異性を確認するための実験を示す。図3のBは、実験に使用したsiRNAの標的部位を示す。sidx2は、AIMP2-DX2のexon1-exon3接合部分、si exon4 #1と#2は、それぞれexon4の異なる部分を標的とする。“C”は対照群(control)を意味する。

20

【図4A】図4は、H5 IgG抗体とAIMP2-DX2抗原ペプチドの結合力を確認するための表面プラズモン共鳴(surface plasmon resonance)実験を示す。H5抗体とIgGタンパク質をCM5チップにコーティングして、AIMP2-DX2抗原ペプチドを多様な濃度で流して、抗原ペプチドと抗体との間の結合反応の程度をセンサーグラム(sensorgram)で示した。センサーグラムのx軸は時間(秒、s)、y軸は反応単位(response unit、RU)を表示する。ボックスの中は、AIMP2-DX2抗原ペプチドの濃度を示し(単位はすべてnM)、図4のAとBで全て同じである。

【図4B】図4は、H5 IgG抗体とAIMP2-DX2抗原ペプチドとの結合力を確認するための表面プラズモン共鳴(surface plasmon resonance)実験を示す。H5抗体とIgGタンパク質をCM5チップにコーティングして、AIMP2-DX2抗原ペプチドを多様な濃度で流して、抗原ペプチドと抗体との間の結合反応の程度をセンサーグラム(sensorgram)で示した。センサーグラムのx軸は時間(秒、s)、y軸は反応単位(response unit、RU)を表示する。ボックスの中は、AIMP2-DX2抗原ペプチドの濃度を示し(単位はすべてnM)、図4のAとBで全て同じである。

30

【図5A】図5は、H5 Fabの結合特異性を確認するためのウェスタンブロット実験を示す。H460細胞溶解物を電気泳動したブロットを、野生型AIMP2とAIMP2-DX2に全て結合する#324抗体と反応させた結果を示す。ブロットにおいて、野生型AIMP2(“AIMP2”)とAIMP2-DX2(“DX2”)のタンパク質バンドの位置は、それぞれ赤い矢印で示されている。

【図5B】図5は、H5 Fabの結合特異性を確認するためのウェスタンブロット実験を示す。H460細胞溶解物を電気泳動したブロットを、野生型AIMP2とAIMP2-DX2に全て結合するH5 Fabと反応させた結果を示す。ブロットにおいて、野生型AIMP2(“AIMP2”)とAIMP2-DX2(“DX2”)のタンパク質バンドの位置は、それぞれ赤い矢印で示されている。

40

【発明を実施するための形態】

【0077】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0078】

但し、下記の実施例は、本発明を例示するものであって本発明の内容が下記の実施例に限定されるものではない。

50

【0079】

<実施例1>

キメラF a bライブラリ製作

A I M P 2 - D X 2 に特異的に結合する抗原結合部位 (antigen-binding site) をスクリーニングするためのウサギ／ヒトキメラ (chimeric) F a b ライブラリーを構築した。ウサギの免疫化 (immunization)、ウサギ脾臓細胞 (splenocyte) からの m R N A の分離と c D N A 合成、さらに、ウサギ／ヒトキメラ F a b 抗体ライブラリーの構築は、基本的に “Phage Display: A Laboratory Manual” (Barbas, C.F. 3rd. et al. Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press) によって公知にされた方法に基づいて行った。

【0080】

具体的には、野生型 A I M P 2 タンパク質と A I M P 2 - D X 2 突然変異タンパク質とを区別することができる抗原決定部として、A I M P 2 - D X 2 で e x o n 1 と e x o n 3 が接合した部分のポリペプチドを利用した (図 1 B 参照、アミノ酸配列 GHVQDYGALKD)。前記 A I M P 2 - D X 2 抗原ペプチドの C - 末端に、運搬体 (キャリア) タンパク質であるキーホールリンペットヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin, K L H) タンパク質を接合するために、システイン (C) アミノ酸を追加した。K L H に接合された A I M P 2 - D X 2 抗原ペプチドをウサギに接種して免疫反応を誘導して、ウサギの脾臓を得て、m R N A を分離し、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) を利用して、キメラ F a b ライブラリーの構築に必要なウサギ抗体の可変領域の相補的 D N A (c D N A) を製作した。c D N A の製作に使用されたプライマーは、表 1 に記載された通りである。製作された c D N A から、表 2 に記載されたプライマーの組み合わせと表 3 に記載された P C R 条件を利用して、ウサギ抗体の重鎖と軽鎖可変領域の D N A を増幅した。増幅された P C R 産物は、1. 0 % アガロースゲルで電気泳動して分離した後、g e l e x t r a c t i o n k i t (ゲル抽出キット) を利用して精製した。

【0081】

【表1】

RT-PCRプライマー

正方向プライマー								
重鎖 (配列番号)	RVH1 (25)	RVH2 (26)	RVH3 (27)	RVH4 (28)	RVH5 (29)	RVH6 (30)		
軽鎖(κ) (配列番号)	RVK1 (31)	RVK2 (32)	RVK3 (33)	RVK4 (34)	RVK5 (35)	RVK6 (36)	RVK7 (37)	RVK8 (38)
軽鎖(λ) (配列番号)	RVL1 (39)	RVL2 (40)	RVL3 (41)	RVL4 (42)	RVL5 (43)	RVL6 (44)		
逆方向プライマー								
重鎖 (配列番号)	RJH-b (45)							
軽鎖(κ) (配列番号)	RJK1-b (46)	RJK2-b (47)	RJK3-b (48)	RJK4-b (49)				
軽鎖(λ) (配列番号)	RJL-b (50)							

(プライマー下段括弧内の数字は該当プライマーの配列番号を示す)

【0082】

【表 2】

RT-PCRに使用したプライマーの組合せ

44個のプライマーの組合せ								
重鎖	RVH1 RJH-b	RVH2 RJH-b	RVH3 RJH-b	RVH4 RJH-b	RVH5 RJH-b	RVH6 RJH-b		
軽鎖 (κ)	RVK1 RJK1-b	RVK2 RJK1-b	RVK3 RJK1-b	RVK4 RJK1-b	RVK5 RJK1-b	RVK6 RJK1-b	RVK7 RJK1-b	RVK8 RJK1-b
	RVK1 RJK2-b	RVK2 RJK2-b	RVK3 RJK2-b	RVK4 RJK2-b	RVK5 RJK2-b	RVK6 RJK2-b	RVK7 RJK2-b	RVK8 RJK2-b
	RVK1 RJK3-b	RVK2 RJK3-b	RVK3 RJK3-b	RVK4 RJK3-b	RVK5 RJK3-b	RVK6 RJK3-b	RVK7 RJK3-b	RVK8 RJK3-b
	RVK1 RJK4-b	RVK2 RJK4-b	RVK3 RJK4-b	RVK4 RJK4-b	RVK5 RJK4-b	RVK6 RJK4-b	RVK7 RJK4-b	RVK8 RJK4-b
	RVK1 RJK4-b	RVK2 RJK4-b	RVK3 RJK4-b	RVK4 RJK4-b	RVK5 RJK4-b	RVK6 RJK4-b	RVK7 RJK4-b	RVK8 RJK4-b
軽鎖 (λ)	RVL1 RJL-b	RVL2 RJL-b	RVL3 RJL-b	RVL4 RJL-b	RVL5 RJL-b	RVL6 RJL-b		

10

【0083】

【表 3】

20

軽鎖と重鎖可変領域DNAを増幅するためのPCR条件

PCR反応 プログラム	30x				
94℃	94℃	56℃	72℃	72℃	4℃
2分	30秒	30秒	30秒	7分	∞

(∞は時間制限がないことを意味する)

30

【0084】

ヒトのFabを含むpComb3XTTから、キメラFabライブラリの構築に必要なヒトの抗体(Fab)の不変領域のDNAを、PCR反応で得た。軽鎖と重鎖不変領域は、pComb3XTT(2640.2ng/ml)プラスミドを鋳型にして、それぞれHKC-F(正方向、配列番号53)、Lead-b(逆方向、配列番号54)のプライマー対と、HIGCH1-F(正方向、配列番号51)、dpseq(逆方向、配列番号52)のプライマー対を利用して、表4に記載されたPCR条件により増幅した。増幅されたPCR産物は、gel extraction kitを利用して精製した。精製された重鎖と軽鎖不変領域のDNAの大きさは、それぞれ400bpと350bpであった。

【0085】

40

【表 4】

軽鎖と重鎖不変領域DNAを増幅するためのPCR条件

PCR反応 プログラム	25x				
94℃	94℃	56℃	72℃	72℃	4℃
2分	30秒	30秒	30秒	10分	∞

(∞は時間制限がないことを意味する)

10

【0086】

予め準備したウサギの抗体の可変領域のDNAと、ヒトの抗体（Fab）の不変領域のDNAは、重複拡張PCR（overlap extension PCR）に連結された。重鎖は、重鎖可変領域DNAと不変領域DNAを混合して鋳型とし、LeadVH（配列番号55）、dpseq（配列番号52）のプライマー対を利用してPCR反応を実施し、軽鎖は、軽鎖可変領域DNAと不変領域DNAを混合して鋳型とし、RSC-SF（配列番号56）、Lead-b（配列番号54）のプライマー対を利用してPCR反応を実施した。PCR条件は、表5に記載された通りである。

20

【0087】

【表 5】

重複拡張PCR条件

PCR反応 プログラム	25x				
94℃	94℃	56℃	72℃	72℃	4℃
2分	30秒	30秒	1分	10分	∞

(∞は時間制限がないことを意味する)

30

【0088】

前記のように製作されたFd重鎖断片（重鎖不変領域＋重鎖可変領域）とキメラ軽鎖（軽鎖不変領域＋軽鎖可変領域）のDNAは、gel extraction kitを利用して分離精製した。重鎖と軽鎖のPCR産物は、それぞれ750bp、800bpであった。最後に、Fd鎖断片とキメラ軽鎖をFab形態で結合させるために、Fd重鎖断片とキメラ軽鎖の混合物を鋳型にして、RSC-SF（配列番号56）、dpseq（配列番号52）のプライマー対を利用して表6に記載された条件に基づいて、PCRを実施した。PCR産物で得られたFab（Fd重鎖＋キメラ軽鎖）は、1.5%ゲルに電気泳動し、gel extraction kitで分離精製した。最終的な結果物は、1500bpの大きさであった。

40

【0089】

【表 6】

Fabを製作するためのPCR条件

PCR反応 プログラム	25x				
94℃	94℃	56℃	72℃	72℃	4℃
2分	30秒	30秒	1. 5分	10分	∞

(∞は時間制限がないことを意味する)

10

【0090】

前記のように製作されたFab DNAはファージ (phage) で発現され、ファージ提示 (ファージディスプレイ; phage-displayed) Fabライブラリを構築することができるように、pComb3XTTベクターに挿入した。具体的には、FabのPCR産物とpComb3XTTベクターを、SfiI制限酵素でそれぞれ切断した後、1%ゲルに電気泳動して分離精製した。制限酵素反応は、5 μgのFab DNAと30 μgのpComb3XTTベクターをそれぞれ2. 5 μlのSfiI制限酵素で切断して実施した。切断されたFab DNAとベクターの大きさは、それぞれ1500 bp、3400 bpである。制限酵素で切断したInsert (インサート) DNAとベクターを3:1

20

【0091】

キメラFab DNAが挿入されたベクターは、電気穿孔法 (electroporation) でER2537大腸菌を形質転換させた。電気穿孔にはSOC培地 (Super Optimal Broth with Catabolite Repression-glucose added) を使用した。冷たい状態に維持したキュベット (cuvette) に、200 μlのER2537大腸菌形質転換受容性細胞 (competent cell) とベクターを混合して電気衝撃を加えた後、すぐにSOCを3 mL添加した。その後、50 mlチューブに移して常温で1時間培養し、1 μl、1/10 μl、1/100 μlの容量で、予め暖めておいたアンピシリンを含む100 mmアガー (agar) プレートに塗布した。別途、汚染の有無を確認するために、カナマイシンとアンピシリンが含有された半分に分けられたプレートにも塗布した。塗布した残りの電気衝撃を受けた大腸菌を4000 g、4℃で15分間遠心分離して上澄み液を除去した後、500 μlのSOCで再分散して150 mmアンピシリンプレートに塗布して、先に大腸菌を塗布した100 mmプレートと共に37℃で約18時間培養した。結果として翌日約10⁷個の形質転換されたコロニーを得た。

30

【0092】

<実施例2>

ファージ提示Fabライブラリパニングとスクリーニング

<2-1>ファージ提示Fabライブラリパニング

40

AIMP2-DX2抗原ペプチドに特異的に結合する抗原結合部位を有するFabを選別するために、前述した実施例で製作した抗体 (Fab) ライブラリパニング (panning) 実験を、公知の方法 (Bai, X. et al. PLoS ONE 2015 doi:10.1371/journal.pone.0141045) により実施した。

【0093】

パニングの一番目の段階として、ヘルパーファージ (helper phage) を大腸菌に導入するライブラリレスキュー (library rescue) を実施した。実験一日前に150 mmプレートに塗布して育ったコロニーを、5 ml LB (Luria-Bertani Broth) に接種して集めた後、このうち100 μlをアンピシリン (50 μg/ml) を含む20 ml SB (Super Broth) に接種し、3時間かけて37℃で220 rpmで振盪培養した。

50

培養液の600nm吸光度(OD600)が0.5に達したとき、500 μ lのVC SM 13ヘルパーファージ(10¹² p f u)を入れた後、再び37℃で120rpmで1時間振盪培養した。その後、カナマイシン(70 μ g/ml)を添加して、30℃でさらに220rpmで18時間振盪培養した。培養物は、12,000rpm、4℃で20分間遠心分離して上澄み液を集めて、5mlの5 $\times$ ポリエチレングリコール(polyethylene glycol、PEG)沈殿溶液(16% PEG-8000、12% NaCl)に添加して30分間氷の上に置いた。そして再び12,000rpmで20分間遠心分離して得た沈殿物(pellet)を、1mlの3%BSAを含むPBSに再分散して、ファージ溶液(phage solution)を準備して、室温に1時間静置した。別途、10mlのLBに160 μ lのER 2537大腸菌を接種して、抗生剤なしで220rpm、37℃で振盪培養した。

10

【0094】

パニングのための免疫試験管(immunotube、Nunc cat. No 470319)は、10 μ gのAIMP2-DX2抗原ペプチド(ウサギ免疫反応に使用した抗原ペプチドをBSAに接合した形)を含む1ml PBSを添加して37℃で1時間反応させ、試験管内部表面に抗原ペプチドを吸着させた。その後、1時間の間、3%脱脂乳(skim milk)が添加されたPBST(tween 20を含むPBS)でブロッキング(blocking)して、抗原が吸着されていない部分が埋まるようにした。ファージライブラリ(10¹² p f u)は、3%脱脂乳と300 μ g BSAを含む1mlのPBSTで1時間ブロッキングした。

20

【0095】

ブロッキングされた免疫試験管にファージライブラリを添加し、37℃で2時間振盪培養して、ファージに発現されたFabと抗原ペプチドとが結合するようにして、5mlのPBSTで3回洗浄した。免疫試験管に結合したファージは、1mlのトリエチルアミン(脱イオン水中に100mM)で、室温で10分間溶出して、直ちに0.5mlのTris(1M、pH 7.0)で中和した後、8.5mlの指数成長中期(mid-log phage)のER 2537大腸菌と混合した。大腸菌とファージ培養物は、120rpm、37℃で1時間の振盪培養し、2%ブドウ糖とアンピシリンを含むLBアガープレートに塗布して、37℃で一晩培養した。プレートで育った大腸菌は、約10⁸細胞をアンピシリンを含む20mlのSB培地(super broth: 3% トリプトン、2% 酵母エキス、1% MOPS、pH 7.0)に接種して培養し、OD600が0.7に達したとき、10¹² p f uのVC SM 13ヘルパーファージを添加した。37℃で1時間、80rpmで攪拌して、カナマイシン(70 μ g/ml)を追加して、200rpm、30℃で一晩培養した。培養液を遠心分離し、ファージを5mlの5 $\times$ PEG沈殿溶液(20% (w/v) PEG 8000、15% (w/v) NaCl)で沈殿させて、氷に30分間置いた。沈殿されたファージは、遠心分離して0.3mlのPBSに再分散して、次の段階のパニングに使用した。パニングは、前記の方法で4回繰り返し、パニングで選別された大腸菌コロニーを結果物として得た。

30

【0096】

<2-2>クロンスクリーニング

実施例<2-1>のパニングで選別されたコロニーのファージが発現する抗体(Fab)が、実際にAIMP2-DX2抗原ペプチドに特異的に結合するか否かを確認した。

40

【0097】

まず、2回乃至4回目のパニングから選別されたコロニーのうち、BSAに接続されたAIMP2-DX2抗原ペプチドに結合するコロニーを、Bai, X. et al. (2015)の方法によりELISA実験で選別した。ELISA実験のための96well免疫プレートは、AIMP2-DX2抗原ペプチド(10 μ l/ml)でコーティングし、180 μ lの3%BSA-PBSTでブロッキングした。抗体を発現する大腸菌の培養液は、3500rpmで15分間遠心分離して沈殿させ、40 μ lの1 $\times$ TES(20% スクロース、1mM EDTA、50mM TRIS、pH 8.0)と60 μ lの0.2 $\times$ TESを順番に入れて分散させ、細胞外膜を除去して細胞質抽出物(periplasmic extract)

50

を製造した。これを遠心分離して得られた上澄み液 25 μ l を、抗原ペプチドでコーティングした免疫プレートに添加して、1 時間反応させた。反応が終わったプレートは、PBST で 3～4 回洗浄して、2 次抗体として 3 % BSA-PBST で希釈した anti-human (抗ヒト) IgG (Fab 特異的)-HRP (1 : 1000) を 25 μ l ずつ添加して、1 時間常温で反応させた。プレートを洗浄して、テトラメチルベンジジン (TMB) を 25 μ l 添加して 10 分間発色反応を進行した後、硫酸 (H_2SO_4 , 1 mM) を 25 μ l ずつ添加して反応を停止させた。ELISA 実験の陰性対照群は、抗原ペプチドの代わりに BSA を使用した実験であり、背景 (background) と比べて 3 倍以上強い信号を示すコロニーを選別した。

【0098】

ELISA で選別されたコロニーの抗体クローンは、ウェスタンブロットを利用して、AIMP2-DX2 の結合特異性を確認した。先に選別された大腸菌コロニーを、アンピシリンを含む 20 mL SB 培地で培養し、OD600 が 0.7 に達したとき IPTG (1 mM final) を添加して、一晚 30 $^{\circ}C$ で振盪培養した。遠心分離して沈殿させた大腸菌に、1 mL の冷たい 1 $\times$ TES を添加して再分散して、1.5 mL の冷たい 0.2 $\times$ TES を入れて氷の中で 30 分間培養し、細胞質抽出物を製造した。遠心分離して得た上澄み液を 3 % 脱脂乳-PBST と 1 : 1 で混合して、ウェスタンブロットの 1 次抗体 (primary antibody) に使用した。2 次抗体 (secondary antibody) には、anti-HA tag antibody-HRP (抗 HA 標識抗体-HRP) 又は anti-human Fab antibody-HRP (抗ヒト Fab 抗体-HRP) を使用した。AIMP2-DX2 を発現する結腸がん細胞株の SW460 細胞溶解物を利用して、ウェスタンブロットを行った結果、クローン H5 の抗体 (Fab) が、25 kDa の大きさの AIMP2-DX2 に特異的に結合することが分かった (データ図示せず)。

【0099】

ELISA 実験を通じて結合が確認された H5 クローンの Fab をコードする DNA の塩基配列を、sequencing (塩基配列決定法) で確認した。確認された H5 Fab の重鎖と軽鎖の CDR の塩基配列とアミノ酸配列は、本明細書の配列表の配列番号 3 乃至配列番号 14 に記載されている。また、H5 Fab の重鎖と軽鎖可変領域の塩基配列とアミノ酸配列は、本明細書の配列表の配列番号 15 乃至配列番号 18 に記載されている通りである。H5 Fab の重鎖部分 (Fd、ウサギ抗体から由来した重鎖可変領域とヒト抗体の重鎖 CH1 ドメイン) の塩基配列とアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 24 と配列番号 23 に記載されており、H5 Fab の軽鎖部分 (ウサギ抗体から由来した軽鎖可変領域とヒト抗体の軽鎖 C κ ドメイン) の塩基配列とアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 22 と配列番号 21 に記載されている。

【0100】

前記のように、固有の配列が確認された H5 Fab は、より一般的に使用される形態である IgG 形態の全体抗体に変換した。Fab を IgG 抗体に変換する通常の方法によって、H5 Fab の重鎖及び軽鎖の可変領域の DNA を PCR で増幅し、ヒトの IgG1 の重鎖及び軽鎖不変領域の遺伝子がクローニングされている pVITRO1 ベクターに適切な制限酵素を利用して挿入した。このように製作された H5 IgG 抗体の重鎖 (ウサギ抗体から由来した重鎖可変領域とヒト抗体の重鎖不変領域) と H5 IgG 抗体の軽鎖 (ウサギ抗体から由来した軽鎖可変領域とヒト抗体の軽鎖 C κ ドメイン) の塩基配列とアミノ酸配列は、本明細書の配列目録の配列番号 19 乃至配列番号 22 に記載されている通りである。H5 IgG 抗体の軽鎖の塩基配列とアミノ酸配列は、H5 Fab の軽鎖の配列と同一である。H5 IgG の DNA を含むベクターは 293F 細胞株で発現させて protein G affinity chromatography (タンパク質 G アフィニティークロマトグラフィー) で分離精製した。

【0101】

<実施例 3>

選別されたクローンの AIMP2-DX2 に対する結合特異性確認

10

20

30

40

50

H5抗体又は断片(Fab)のAIMP2-DX2に対する結合特異性をさらに詳しく確認した。

【0102】

まず、H5 FabがAIMP2-DX2に特異的に結合するか否かを抗原吸着(antigen preadsorption)実験で調べた(図1)。AIMP2-DX2を発現する肺がん細胞株のH460細胞溶解物を電気泳動して、AIMP2-DX2抗原ペプチド(100 µg/ml)存在下でH5 Fab(図1のA、“+”)で、又は抗原ペプチドを添加していない条件でH5 Fab(図1のA、“-”)で、ウェスタンブロットを実施した。抗原ペプチドと反応していないH5 Fabは、AIMP2-DX2タンパク質バンドを感知したが、抗原ペプチドが追加された条件でのH5 Fabは、AIMP2-DX2タンパク質のバンドとは全く反応しないので、H5 FabがAIMP2-DX2に特異的に結合することを示した。

10

【0103】

さらにH460細胞において、AIMP2-DX2の発現を抑制する方法で、H5 FabのAIMP2-DX2に対する結合特異性を確認した(図3)。AIMP2-DX2のexon1-exon3接合部分又はexon4を標的とするsiRNA(図3のB、それぞれ“siDX2”(配列番号57)、“si exon4#1”(配列番号58)、“si exon4#2”(配列番号59))でH460細胞を形質転換して、72時間培養した。培養された細胞の溶解物についてH5 Fabでウェスタンブロットを実施した結果(図3のA)、AIMP2-DX2のexon1-exon3接合部分だけではなく、exon4を標的とするsiRNAで形質転換された細胞溶解物からも、H5 FabによってAIMP2-DX2タンパク質バンドが感知されなかった。siRNAによって、AIMP2-DX2変異体のmRNAが全て分解されたからであると判断される。

20

【0104】

AIMP2-DX2タンパク質のN-末端アミノ酸欠失がH5 FabとAIMP2-DX2タンパク質の結合に影響を与えるかを調べた(図2)。AIMP2-DX2タンパク質のN-末端のアミノ酸残基は、AIMP2-DX2タンパク質の溶解性に重要な影響を与えることが知られている(韓国特許出願第10-2014-0058634号)。AIMP2-DX2タンパク質のN-末端から2個、23個、又は33個のアミノ酸が欠損した形態のAIMP2-DX2(図2のB)にstreptagを接合して、HEK293T細胞からそれぞれ発現させて、H5 Fabでウェスタンブロット実験を実施した。図2のAに示した通り、H5 Fabは、全体の長さのAIMP2-DX2タンパク質だけではなく、N-末端が欠損した形態のAIMP2-DX2にも全てよく結合することが分かった。一方、AIMP2-DX2抗原ペプチドが存在する条件において、H5 Fab(“H5+epitope peptide”)は、全体の長さ又はN-末端が欠損したAIMP2-DX2のいずれにも結合していないので、H5 FabがAIMP2-DX2タンパク質に特異的に結合することを再確認した。

30

【0105】

IgG形態に変換したH5抗体のAIMP2-DX2抗原に対する結合力を、表面プラズモン共鳴実験で確認した(図4)。H5抗体(IgG)とIgGタンパク質をCM5チップにコーティングして、AIMP2-DX2抗原ペプチドを、多様な濃度で流して、H5抗体と結合反応の程度を測定した。分析試料やバッファは、15 µl/minの流速で6分間注入して20分間洗浄した。H5抗体及びIgGがそれぞれ抗原ペプチドと反応した反応の結果から、タンパク質がコーティングされていないblankの反応値を差引いたsensorgram(センサーグラム)で分析した。その結果、図4に示した通り、H5抗体では抗原ペプチドの濃度に比例して結合が増加したが、IgGではタンパク質と抗原ペプチドの有意な結合を観察することができなかった。IgGに変換された形態のH5抗体も、FabのAIMP2-DX2抗原に対する結合力を維持していることが分かった。

40

50

【0106】

最後に、H5抗体が野生型(WT)AIMP2タンパク質とAIMP2-DX2を区別することができるか否かを確認した(図5)。野生型AIMP2とAIMP2-DX2を区別せずに結合する#324抗体と、H5 Fabを利用して、H460細胞溶解物でウェスタンブロットを実施して、結果を比較した。#324抗体が野生型AIMP2とAIMP2-DX2に全て結合したものと対照的に(図5のA)、H5 Fabは、野生型AIMP2には全く結合せずに、AIMP2-DX2にのみ特異的に結合することが分かった(図5のB)。つまりH5抗体を利用して、AIMP2-DX2のみを選択的に感知することを確認した。H5 IgG抗体は、H5 Fabの可変領域をそのまま含めて、抗原に対する結合特性を維持しているので、H5 IgG抗体でもH5 Fabと同じ結果を得られることが分かった。

10

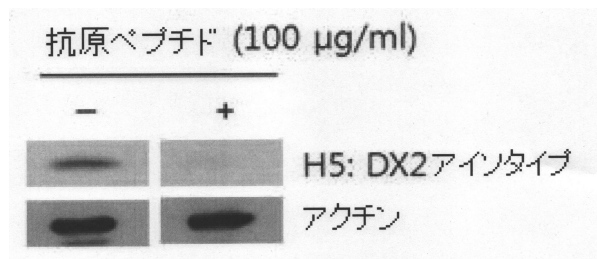
【産業上の利用可能性】

【0107】

以上述べた通り、本発明に係る抗体は野生型AIMP2には反応せず、exon2が欠損したAIMP2-DX2突然変異パク質に特異的に結合するので、AIMP2-DX2タンパク質の存在と発現程度確認に有用に利用することができる。AIMP2-DX2タンパク質は、がんと炎症性疾患などの病理に関連しており、特に肺がん、乳がん、大腸がんなどのがん疾患で過剰発現されているので、AIMP2-DX2をがんの発生と進行のバイオマーカーとして感知するためのがん診断用組成物の開発に有用に利用することができる。

20

【図1A】



【図1B】

DX2 アミノ酸配列

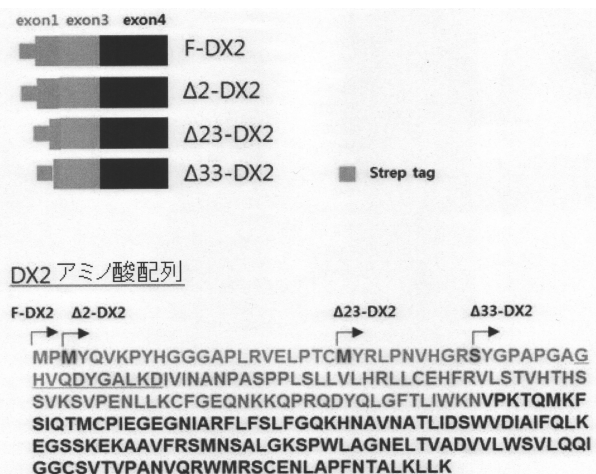
```

MPMYQVKPYHGGGAPLRVELPTCMYRLPNVHGRSYGPAPGAGHVQDYGALKDIVI
NANPASPPPLSLVLHRLLCHEFRVLSTVHTSSVKSPENLLKCFGEQNKQPRQD
YQLGFTLIWKVNPQTQMKFSIQTMCPGEGGNIARFLFSLFGQKHNAVNATLDSWVD
IAIFQLKEGSSKEKA AVFRSMNSALGKSPWLAGNELTVADVVLWSVLQIGGCSVT
VPANVQRWMRSCENLAPFNTALKLLK
  
```

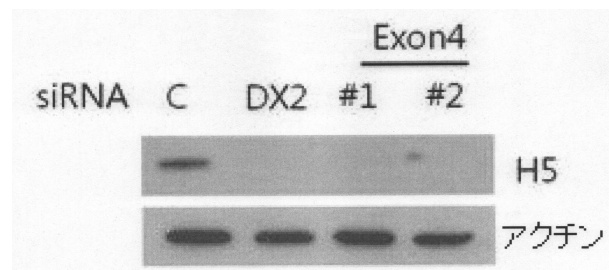
【図2A】



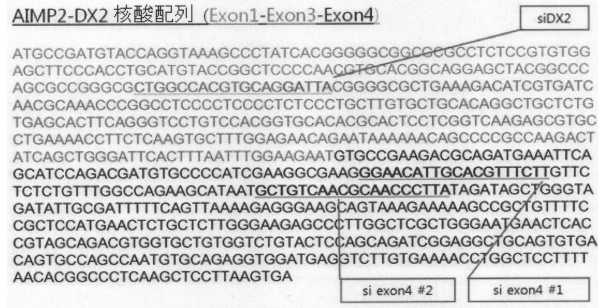
【図2B】



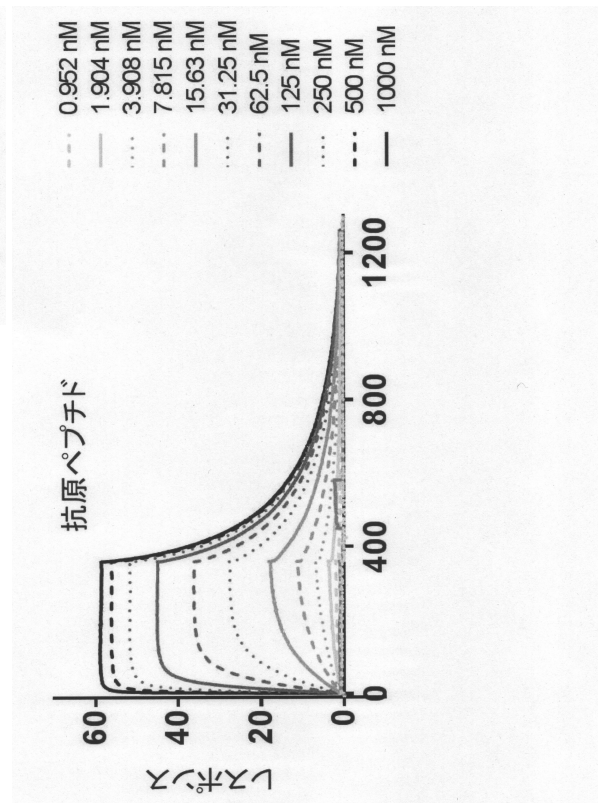
【図3A】



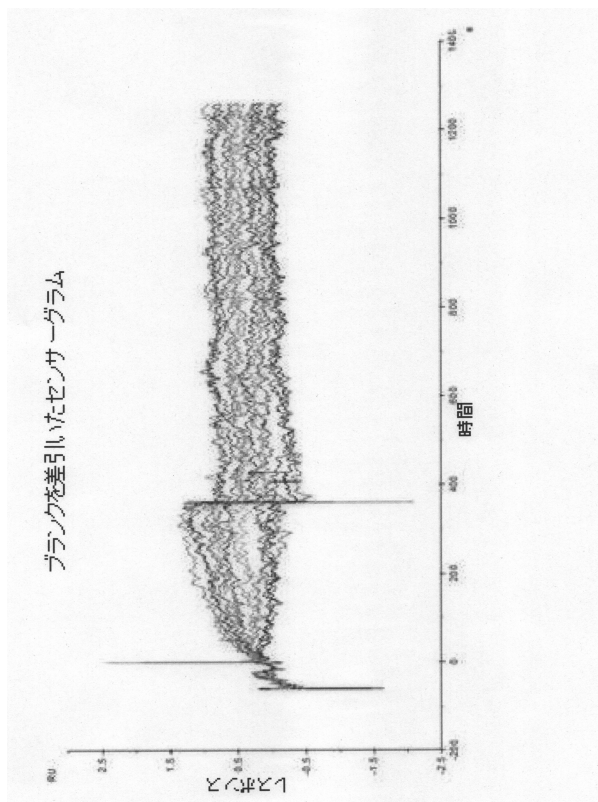
【図 3 B】



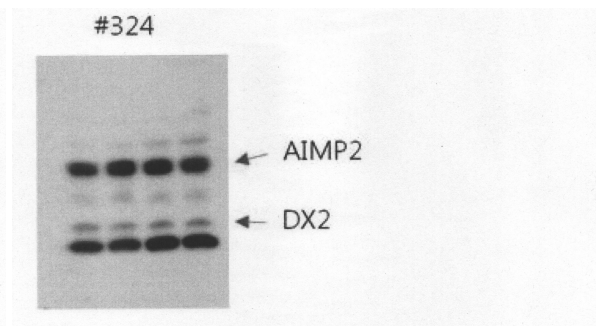
【図 4 A】



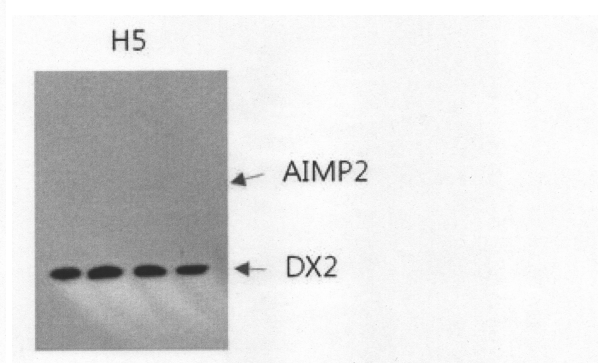
【図 4 B】



【図 5 A】



【図 5 B】



【配列表】

0006967523000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K 16/18
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	G 0 1 N 33/574 A

(74)代理人 110002354

特許業務法人平和国際特許事務所

(72)発明者 キム、スンフン

大韓民国 0 6 2 6 9 ソウル、カンナムーグ、3 6 5ーギル、ナムブスナンーロ、4 2、# 4ー1 0 0 5 (ドゴクードン、ドゴク ハンシン アパート)

(72)発明者 ソン、チュンシク

大韓民国 0 6 0 5 9 ソウル、カンナムーグ、ソナルンーロ 1 3 1ーギル、2 2ー4

(72)発明者 クォン、ナム フン

大韓民国 0 7 0 0 7 ソウル、トンジャクーク、サダンーロ 2 9ナーギル、3ー4、2階 (サダンードン)

(72)発明者 シム、ヒョンボ

大韓民国 0 6 0 0 7 ソウル、カンナムーグ、アブグジョンーロ、3 2 1、# 3ー1 2 0 6 (アブグジョンードン、ハニャン アパート)

(72)発明者 グェン チ、トゥーハー

大韓民国 0 4 1 0 8 ソウル、マポーグ、シンチョンーロ、2 4ーギル、4 0、# 1 0 1 (ノゴサンードン)

審査官 山本 晋也

(56)参考文献 特表2 0 0 8ー5 2 1 3 9 8 (JP, A)

特表2 0 1 9ー5 1 2 6 9 3 (JP, A)

特表2 0 1 4ー5 3 1 4 0 2 (JP, A)

特表2 0 1 6ー5 2 1 7 4 2 (JP, A)

米国特許出願公開第2 0 1 1/0 1 1 7 5 7 2 (US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N

C 1 2 P

C 0 7 K

G 0 1 N

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)