



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I703155 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：107125876

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 07 月 26 日

(51)Int. Cl. : C07K16/18 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

G01N33/574 (2006.01)

G01N33/577 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2017/07/28 南韓

10-2017-0096370

(71)申請人：東亞大學校產業協力團 (南韓) DONG-A UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION
FOR INDUSTRY-ACADEMY COOPERATION (KR)

南韓

新加坡商普雷斯蒂奇生物製藥私人有限公司 (新加坡) PRESTIGE BIOPHARMA PTE.
LTD. (SG)

新加坡

(72)發明人：高祥錫 KOH, SANG SEOK (KR) ; 金妍廷 KIM, YEON JEONG (KR) ; 尹昭恩
YOUN, SO EUN (KR) ; 金松鐵 KIM, SONG CHEOL (KR) ; 洪承模 HONG, SEUNG-
MO (KR) ; 鄭盛允 JEONG, SEONG-YUN (KR)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

KR 10-1098186B1

WO 2007/145466A1

SUN A. KIM, "Pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor (PAUF),
a novel up-regulated secretory protein in pancreatic ductal
adenocarcinoma", Cancer Science, Vol. 100, No. 5, May 2009, pages
828-836.

審查人員：張茜毓

申請專利範圍項數：14 項 圖式數：16 共 72 頁

(54)名稱

特異性結合至 P A U F 蛋白質的抗體及其用途

(57)摘要

本發明係有關特異性結合至胰腺癌上調因子(PAUF)蛋白質的抗體及其用途。

本發明抗體以高特異性及親和力結合 PAUF 蛋白質並從而抑制增殖、遷移、侵入及體內生長，
因此本發明抗體可有效地使用在對諸如癌症等 PAUF 蛋白質過度表現的疾病之診斷及治療的領域。The present invention relates to an antibody specifically binding to a pancreatic adenocarcinoma
upregulated factor (PAUF) protein and use thereof.The antibody of the present invention binds to a PAUF protein with high specificity and affinity and
thereby inhibits the proliferation, migration, invasion, and in vivo growth, and thus the antibody of the
present invention can be effectively used in the field of diagnosis and treatment of diseases such as cancer
in which PAUF proteins are overexpressed.

I703155

發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

特異性結合至 PAUF 蛋白質的抗體及其用途

ANTIBODY SPECIFICALLY BINDING TO PAUF

PROTEIN AND USE THEREOF

【中文】

本發明係有關特異性結合至胰腺癌上調因子(PAUF)蛋白質的抗體及其用途。

本發明抗體以高特異性及親和力結合 PAUF 蛋白質並從而抑制增殖、遷移、侵入及體內生長，因此本發明抗體可有效地使用在對諸如癌症等 PAUF 蛋白質過度表現的疾病之診斷及治療的領域。

【英文】

The present invention relates to an antibody specifically binding to a pancreatic adenocarcinoma upregulated factor (PAUF) protein and use thereof.

The antibody of the present invention binds to a PAUF protein with high specificity and affinity and thereby inhibits the proliferation, migration, invasion, and *in vivo* growth, and thus the antibody of the present invention can be effectively used in the field of diagnosis and treatment of diseases such as cancer in which PAUF proteins are overexpressed.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

本案圖式皆為實驗數據，故本案無指定代表圖。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

本案無代表化學式。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

特異性結合至 PAUF 蛋白質的抗體及其用途

ANTIBODY SPECIFICALLY BINDING TO PAUF
PROTEIN AND USE THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明係有關特異性結合至胰腺癌上調因子(PAUF)蛋白質的抗體及其用途。

【先前技術】

【0002】 目前臨床上使用的抗癌藥物可分為化學治療劑及生物治療劑。過去積極開發的化學治療劑是對癌細胞顯示毒性的藥物。然而，這些藥物的問題是，它們對正常細胞及癌細胞都是有毒的，並且還有耐受性的問題。所以，這些藥物的開發及使用有局限性。因此，近年來，正在積極開發可恢復或增加人體免疫功能從而削弱癌細胞活性的生物治療劑作為另一種選擇。目前正在使用或正在開發中的生物治療劑的實例包含細胞激素、重組抗體(如，單株抗體)、核酸分子治療劑、血管生成抑制劑等。

【0003】 在生物治療劑中，用於治療的單株抗體由於對標靶具有高反應特異性而具有低副作用的特點。抗體經由各種機制展現治療效果；例如，它們可特異性結合相應的抗原而抑制訊息傳導，或經由交聯誘發細胞凋亡，此外，還可以經由活化體內免疫系統而展現治療效果。據此，作

為抗癌劑的單株抗體可以特異性地追蹤癌細胞並抑制其活性，以及誘發免疫反應，從而可以有效地去除癌細胞。所以，使用單株抗體的治療正在成為主流癌症治療。在這方面，已經開發出諸如雷莫魯單抗(ramucirumab)、利妥昔單抗(rituximab)、曲妥珠單抗(trastuzumab)等單株抗體，並用於治療胃癌、乳癌、肝癌等。

【0004】 同時，在諸如胰臟癌、卵巢癌、結腸癌、子宮頸癌等癌細胞中過度表現且涉及腫瘤的發展及轉移的胰腺癌上調因子(PAUF)蛋白質，已知經由一種新的磷酸化模式上調及穩定 β -鏈蛋白(β -catenin)，進而促進胰臟癌細胞的快速增殖(*Experimental & Molecular Medicine*, 2011, 43, 82 to 90)。此外，據報導，因為靶向 PAUF 蛋白質的小干擾 RNA 可以降低胰臟癌細胞的遷移、侵入及致瘤能力，所以對 PAUF 蛋白質作為癌症診斷、治療等的標靶的興趣越來越大(*Cancer Sci.*, 2009 May, 100(5): 828 to 836; *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Nov, 454(1): 144 to 150)。在這方面，先前開發了含有抗 PAUF 蛋白質人抗體的胰臟癌診斷及治療組合物(KR Patent No.10-1098186)。然而，仍然需要開發對各種癌症診斷及治療具有優異效果的抗體，且同時提高對 PAUF 蛋白質的結合能力及親和力。

【發明內容】

[技術問題]

【0005】 本發明者等人努力開發能夠特異性結合 PAUF 蛋白質並對各種癌症的治療及診斷展現優異效果的

抗體。結果，他們開發了基於抗 PAUF 小鼠抗體的嵌合及人源化抗體，並確認這些抗體對 PAUF 蛋白質具有較高的親和力及特異性，且相較於現有的抗 PAUF 蛋白質人抗體，對胰臟癌、卵巢癌等的抗癌活性更高，從而完成本發明。

[技術解決方案]

【0006】 本發明的目的是提供結合至胰腺癌上調因子(PAUF)蛋白質的抗體。

【0007】 本發明的另一個目的是提供編碼抗體的多核苷酸。

【0008】 本發明的再另一個目的是提供含有多核苷酸的表現載體。

【0009】 本發明的再另一個目的是提供引入表現載體的轉形體。

【0010】 本發明的再另一個目的是提供含有抗體而用於預防或治療癌症的醫藥組成物。

【0011】 本發明的再另一個目的是提供預防或治療癌症的方法，該方法包含給予個體抗體。

【0012】 本發明的再另一個目的是提供抑制癌細胞增殖、遷移或侵入的方法，該方法包含給予個體抗體。

【0013】 本發明的再另一個目的是提供抗體藥物共軛物，其中藥物係與抗體共軛。

【0014】 本發明的再另一個目的是提供含有抗體的癌症診斷組成物。

【0015】 本發明的再另一個目的是提供含有組成物

的癌症診斷試劑組。

【0016】 本發明的再另一個目的是提供癌症診斷方法，該方法包含使用抗體的抗原抗體反應檢測自疑似罹癌個體分離出的生物樣品中的 PAUF 蛋白質。

【0017】 本發明的再另一個目的是提供篩選用於預防或治療癌症之材料的方法，包含：(a) 以預防或治療癌症的候選材料處理癌細胞；(b) 使用抗體測量經候選材料處理之癌細胞中的 PAUF 蛋白質的量；及(c) 當步驟(b)中的 PAUF 蛋白質的量低於未用候選材料處理的癌細胞之 PAUF 蛋白質的量時，決定在步驟(a)中處理的候選材料是否可以用作預防或治療癌症的材料。

[發明之有利功效]

【0018】 本發明係有關特異性結合至胰腺癌上調因子(PAUF)蛋白質的抗體及其用途。

【0019】 本發明抗體以高特異性及親和力結合至 PAUF 蛋白質，從而抑制增殖、遷移、侵入及體內生長，而因此本發明抗體可有效地使用在對諸如癌症等過度表現 PAUF 蛋白質的疾病之診斷及治療的領域。

【圖式簡單說明】

【0020】 第 1 圖顯示說明抗 PAUF 蛋白質小鼠抗體 2H2 及 20C5，對 PAUF 蛋白質之親和力(A)及特異性(B)之圖示。

【0021】 第 2 圖顯示說明 2H2 及 20C5 各具有與 PMAb83(即，現有的抗 PAUF 蛋白質人抗體)不同之表位的

圖示，並且該圖示顯示經生物素標記的 2H2 的競爭法 ELISA 之結果。

【0022】 第 3 圖顯示說明抗 PAUF 蛋白質嵌合抗體 cPMAb22 及 cPMAb205，各對 PAUF 蛋白質之特異性的圖示。使用 PMAb83(即，人抗體)作為對比組。

【0023】 第 4 圖顯示說明基於 ELISA 檢測結果，cPMAb22 及 cPMAb205 各對 PAUF 蛋白質之親和力的圖示。使用 PMAb83(即，人抗體)作為對比組。

【0024】 第 5 圖顯示說明基於 WST-1 增殖檢測結果，cPMAb22 對癌細胞增殖之抑制效果的圖示。具體地，確認 cPMAb22 對 BxPC-3(即，胰臟癌細胞株)增殖的抑制效果。使用 IgG 作為對照組及使用 PMAb83 作為對比組。

【0025】 第 6 圖顯示說明基於遷移檢測結果，cPMAb22 對癌細胞遷移之抑制效果的圖示。具體地，確認 cPMAb22 對 CFPAC-1(即，胰臟癌細胞株)及 AMCPAC04(即，衍生自胰臟癌患者之胰臟癌細胞)的抑制效果。使用 PMAb83 作為對比組。

【0026】 第 7 圖顯示說明基於侵入檢測結果，cPMAb22 對癌細胞侵入之抑制效果的圖示。具體地，確認 cPMAb22 對 CFPAC-1(即，胰臟癌細胞株)及 AMCPAC04(即，衍生自胰腺癌患者之胰臟癌細胞)的抑制效果。使用 PMAb83 作為對比組。

【0027】 第 8 圖顯示說明基於 ELISA 檢測結果，根據本發明具體例製備的抗 PAUF 蛋白質人源化

抗體 2H2-V_H1-V_L1、2H2-V_H1-V_L2 及 2H2-V_H1-V_L3 對 PAUF 蛋白質之親和力的圖示。使用人抗體 PMAb83 作為對比組。使用 cPMAb22(即，嵌合抗體)及 PMAb83(即，人抗體)作為對比組。

【0028】 第 9 圖顯示說明基於西方墨點分析結果，2H2-V_H1-V_L1、2H2-V_H1-V_L2 及 2H2-V_H1-V_L3 之生產收率的圖像，其中第 1 道代表 2H2-V_H1-V_L1，第 2 道代表 2H2-V_H1-V_L2，第 3 道代表 2H2-V_H1-V_L3，第 4 道代表 2H2-V_H2-V_L1，第 5 道代表 2H2-V_H2-V_L2，第 6 道代表 2H2-V_H2-V_L3，第 7 道代表 2H2-V_H3-V_L1，第 8 道代表 2H2-V_H3-V_L2，第 9 道代表 2H2-V_H3-V_L3 及第 10 道代表 2H2-V_H4-V_L4，及 A 道代表未經離心之含有蛋白質的培養基，B 道代表經離心去除碎屑後以 0.22 μm 過濾器過濾之含有蛋白質的培養基，及 C 道代表 Fc 蛋白質。使用 Fc 蛋白質作為對照組。

【0029】 第 10 圖顯示說明人源化抗體 2H2-V_H1-V_L1(即，hPMAb22)對 PAUF 蛋白質之特異性的圖示。使用 PMAb83(即，人抗體)作為對比組。

【0030】 第 11 圖顯示說明基於表面電漿子共振(SPR)分析結果，hPMAb22 對 PAUF 蛋白質之親和力的圖示。使用 PMAb83(即，人抗體)作為對比組。

【0031】 第 12 圖顯示說明 hPMAb22 具有與 PMAb83 不同之表位的圖示，PMAb83 是 hPMAb22 的抗 PAUF 人蛋白質，並且該圖示顯示經生物素標記的 PMAb83 的競爭法 ELISA 之結果。

【0032】 第 13 圖顯示說明基於 WST-1 增殖檢測結果，hPMAb22 對癌細胞增殖之抑制效果的圖示。具體地，確認 hPMAb22 對 CFPAC-1(即，胰臟癌細胞株)的抑制效果。使用 IgG 作為對照組及使用 PMAb83 作為對比組。

【0033】 第 14 圖顯示說明基於遷移檢測結果，hPMAb22 對癌細胞遷移之抑制效果的圖示。具體地，確認 hPMAb22 對 AMCPAC06(即，衍生自胰臟癌患者之胰臟癌細胞)及 OVCAR-5(即，卵巢癌細胞株)的抑制效果。使用 PMAb83 作為對比組。

【0034】 第 15 圖顯示說明基於侵入檢測結果，hPMAb22 對癌細胞侵入之抑制效果的圖示。具體地，確認 hPMAb22 對 AMCPAC04 或 AMCPAC06(即，衍生自胰臟癌患者之胰臟癌細胞)及 OVCAR-5(即，卵巢癌細胞株)的抑制效果。使用 PMAb83 作為對比組。

【0035】 第 16 圖顯示說明 hPMAb22 的體內抗癌作用，且從圖示確認經由給藥 hPMAb22 而降低腫瘤的體積及重量。使用 Gemzar[®](健西他濱(gemcitabine))作為對比組。

【實施方式】

【0036】 為達到上述目的，本發明的一態樣提供結合胰腺癌上調因子(PAUF)蛋白質的抗體。

【0037】 在本發明中，發明者等人已經開發抗體，其各包含重鏈可變區，而重鏈可變區包含 SEQ ID NO:1 的重鏈 CDR1、SEQ ID NO:2 或 39 的重鏈 CDR2 及 SEQ ID NO:3、4 或 30 的重鏈 CDR3；及輕鏈可變區，而輕鏈可變區包含 SEQ

ID NO:5 的輕鏈 CDR1、SEQ ID NO:6 的輕鏈 CDR2 及 SEQ ID NO:7 或 31 的輕鏈 CDR3。經確認相較於習知 PAUF 抗體，這些抗體展現對 PAUF 蛋白質顯著較高的親和力及特異性，抑制各種癌症諸如胰臟癌、卵巢癌等之增殖、遷移及侵入，及抑制體內癌的生長。

【0038】 如本文所使用，術語“胰腺癌上調因子 (PAUF)蛋白質”意指涉及腫瘤發展及轉移的蛋白質。已報導 PAUF 蛋白質在諸如胰臟癌、卵巢癌、結腸癌、子宮頸癌等癌細胞中過度表現，因此這些蛋白質可作為癌症診斷、治療等的標靶。(*Cancer Sci.* 2009 May, 100(5): 828 to 36; *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Nov, 454(1): 144 to 50.)。

【0039】 如本文所使用，術語“抗體”意指作為能夠特異性識別抗原的受體之蛋白質分子，它包含與特定抗原有免疫反應的免疫球蛋白分子。本發明抗體可包含所有的多株抗體、單株抗體、全抗體及抗體片段，還有嵌合抗體及二價或雙特異性分子(如，雙特異性抗體)、雙抗體、三抗體及四抗體。此外，本發明抗體包含具有與新生兒 Fc 受體(FcRn)結合功能的單鏈抗體、scAbs、抗體恆定區的衍生物及基於蛋白質支架的人工抗體。

【0040】 全抗體具有兩條全長輕鏈及兩條全長重鏈的結構，其中各輕鏈經由二硫鍵連接到重鏈。全抗體包含 IgA、IgD、IgE、IgM 及 IgG，其中 IgG 包含 IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4 亞型。

【0041】 抗體片段意指具有抗原結合功能的片段，其包含 Fc、Fd、Fab、Fab'、Fv、F(ab')₂ 等。Fc 意指抗體的尾端部分，它與稱為 Fc 受體的細胞表面受體相互作用。Fd 意指包含在 Fab 片段中的重鏈部分，及 F(ab')₂ 意指包含 Fd、Fab、Fab' 及 Fv 的片段。Fab 具有由輕鏈及重鏈的可變區、輕鏈的恆定區及重鏈第一恆定區(CH1 結構域)所組成的結構，及 Fab 具有一個抗原結合位點。Fab' 與 Fab 不同的是它在重鏈 CH1 結構域的 C-端具有包含至少一個半胱氨酸的鉸鏈區。當 Fab' 鉸鏈區的半胱氨酸殘基形成二硫鍵時，即產生 F(ab')₂ 抗體。可變片段(Fv)意指只具有一個重鏈可變區及一個輕鏈可變區的最小片段。經二硫鍵穩定的 Fv(dsFv)抗體片段的特徵是經由二硫鍵連接重鏈可變區及輕鏈可變區，然而單鏈 Fv(scFv)一般的特徵是經由肽連接基以共價鍵連接重鏈可變區及輕鏈可變區。可使用蛋白酶得到這些抗體片段(如，可用木瓜蛋白酶限制性分解全長抗體而得到 Fab，及可用胃蛋白酶分解而得到 F(ab')₂ 片段)，而較佳地，可通過基因重組技術製備。

【0042】 一般來說，免疫球蛋白具有重鏈及輕鏈，而各重鏈及輕鏈包含恆定區及可變區。輕鏈及重鏈可變區包含 3 個稱為互補決定區(下文稱為，“CDR”)的高度變異區及 4 個構架區(下文稱為，“FR”)。各鏈的 CDR 通常具有與抗原之表位結合的作用，且通常從 N 端開始依序稱為 CDR1、CDR2 及 CDR3。此外，各鏈的 FR 可從 N 端開始依序稱為 FR1、FR2、FR3 及 FR4。

【0043】 本發明中，重鏈的可變區可稱為“V_H”；輕鏈的可變區可稱為“V_L”；重鏈的 CDR 可稱為“V_H-CDR1”、“V_H-CDR2”及“V_H-CDR3”；輕鏈的 CDR 可稱為“V_L-CDR1”、“V_L-CDR2”及“V_L-CDR3”；重鏈的 FR 可稱為“V_H-FR1”、“V_H-FR2”、“V_H-FR3”及“V_H-FR4”；及輕鏈的 FR 可稱為“V_L-FR1”、“V_L-FR2”、“V_L-FR3”及“V_L-FR4”。

【0044】 此外，當本發明抗體包含恆定區時，可包含衍生自 IgG、IgA、IgD、IgE 及 IgM 的恆定區，或其組合，或其雜合。

【0045】 如本文所使用，術語“組合”意指編碼同一來源的單鏈免疫球蛋白恆定區的多肽與不同來源的單鏈多肽相連而形成二聚體或多聚體。例如，可從 IgG、IgA、IgD、IgE 及 IgM 恆定區所構成的群組中選擇 2 個或更多個恆定區而形成二聚體或多聚體。

【0046】 如本文所使用，術語“雜合”意指對應於 2 個或更多個不同來源的免疫球蛋白重鏈恆定區的序列存在於免疫球蛋白重鏈恆定區的單鏈中。例如，可能的雜合形式可以由選自 IgG、IgA、IgD、IgE 及 IgM 的 CH1、CH2、CH3 及 CH4 所構成的群組中的 1 至 4 個結構域來組成。

【0047】 此外，本發明中，就其可變區及恆定區而言，抗體可具有相同的來源或不同的來源，而 CDR 與排除 CDR 以外的可變區及恆定區的來源可能相同或不同。

【0048】 如本文所使用，術語“特異性結合至胰腺癌

上調因子(PAUF)蛋白質的抗體”意指可與 PAUF 蛋白質結合從而抑制 PAUF 蛋白質活性的抗體。

【0049】 具體地，特異性結合至胰腺癌上調因子(PAUF)蛋白質的抗體可以是小鼠抗體、嵌合抗體或人源化抗體。

【0050】 具體地，本發明的各抗體可包含：

重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO:1 的重鏈 CDR1；SEQ ID NO:2 或 39 的重鏈 CDR2；及 SEQ ID NO:3、4 或 30 的重鏈 CDR3；及

輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO:5 的輕鏈 CDR1；SEQ ID NO:6 的輕鏈 CDR2；及 SEQ ID NO:7 或 31 的輕鏈 CDR3，

但是抗體並不限於此等。

【0051】 此外，本發明的各抗體可包含：

由胺基酸序列 SEQ ID NO:17、28 或 37 所構成的重鏈可變區；及

由胺基酸序列 SEQ ID NO:18、29 或 38 所構成的輕鏈可變區，但是抗體並不限於此等。

【0052】 此外，本發明的各抗體可包含抗體的重鏈可變區，其包含：

SEQ ID NO:8、19 或 32 的重鏈構架區 FR1；SEQ ID NO:9 或 20 的重鏈 FR2；SEQ ID NO:10、21 或 33 的重鏈 FR3；及 SEQ ID NO:11、12、22、23 或 34 的重鏈 FR4；及

抗體的輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO:13、24 或 35 的輕鏈 FR1；SEQ ID NO:14 或 25 的輕鏈 FR2；SEQ ID NO:15

或 26 的輕鏈 FR3；及 SEQ ID NO:16、27 或 36 的輕鏈 FR4，
但是抗體並不限於此等。

【0053】 在本發明的一具體例中，相較於現有 PAUF 抗體，本發明具有提高的親和力及特異性的各抗體可具體地包含：

重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO:1 的重鏈 CDR1；SEQ ID NO:2 或 39 的重鏈 CDR2；及 SEQ ID NO:3 的重鏈 CDR3；
及輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO:5 的輕鏈 CDR1；SEQ ID NO:6 的輕鏈 CDR2；及 SEQ ID NO:7 的輕鏈 CDR3；

重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO:1 的重鏈 CDR1；SEQ ID NO:2 或 39 的重鏈 CDR2；及 SEQ ID NO:4 的重鏈 CDR3；
及輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO:5 的輕鏈 CDR1；SEQ ID NO:6 的輕鏈 CDR2；及 SEQ ID NO:7 的輕鏈 CDR3；

SEQ ID NO:8 的重鏈 FR1；SEQ ID NO:9 的重鏈 FR2；
SEQ ID NO:10 的重鏈 FR3；及 SEQ ID NO:11 的重鏈 FR4；
及抗體的輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO:13 的輕鏈 FR1；
SEQ ID NO:14 的輕鏈 FR2；SEQ ID NO:15 的輕鏈 FR3；及
SEQ ID NO:16 的輕鏈 FR4；或

【0054】 SEQ ID NO:8 的重鏈 FR1；SEQ ID NO:9 的重鏈 FR2；SEQ ID NO:10 的重鏈 FR3；及 SEQ ID NO:12 的重鏈 FR4；及抗體的輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO:13 的輕鏈 FR1；SEQ ID NO:14 的輕鏈 FR2；SEQ ID NO:15 的輕鏈 FR3；及 SEQ ID NO:16 的輕鏈 FR4；及更具體地，

重鏈可變區，其包含由 SEQ ID NO:17 所構成的重鏈；

及由 SEQ ID NO:18 所構成的輕鏈可變區，

但是抗體並不限於此等。

【0055】 本發明的具體例中，將包含由胺基酸序列 SEQ ID NO:17 所構成的重鏈可變區及由胺基酸序列 SEQ ID NO:18 所構成的輕鏈可變區的抗體命名為“2H2”或“cPMAb22”。

【0056】 此外，本發明的各抗體可具體地包含：

重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO:1 的重鏈 CDR1；SEQ ID NO:2 或 39 的重鏈 CDR2；及 SEQ ID NO:3 的重鏈 CDR3；及輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO:5 的輕鏈 CDR1；SEQ ID NO:6 的輕鏈 CDR2；及 SEQ ID NO:7 的輕鏈 CDR3；

重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO:1 的重鏈 CDR1；SEQ ID NO:2 或 39 的重鏈 CDR2；及 SEQ ID NO:4 的重鏈 CDR3；及輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO:5 的輕鏈 CDR1；SEQ ID NO:6 的輕鏈 CDR2；及 SEQ ID NO:7 的輕鏈 CDR3；

SEQ ID NO:19 的重鏈 FR1；SEQ ID NO:20 的重鏈 FR2；SEQ ID NO:21 的重鏈 FR3；及 SEQ ID NO:22 的重鏈 FR4；及抗體的輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO:24 的輕鏈 FR1；SEQ ID NO:25 的輕鏈 FR2；SEQ ID NO:26 的輕鏈 FR3；及 SEQ ID NO:27 的輕鏈 FR4；或

【0057】 SEQ ID NO:19 的重鏈 FR1；SEQ ID NO:20 的重鏈 FR2；SEQ ID NO:21 的重鏈 FR3；及 SEQ ID NO:23 的重鏈 FR4；及抗體的輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO:24 的輕鏈 FR1；SEQ ID NO:25 的輕鏈 FR2；SEQ ID NO:26 的輕

鏈 FR3；及 SEQ ID NO:27 的輕鏈 FR4；及更具體地，

重鏈可變區，其包含由 SEQ ID NO:28 所構成的重鏈；
及由 SEQ ID NO:29 所構成的輕鏈可變區，

但是抗體不限於此。

【0058】 在本發明的一具體例中，將包含由胺基酸序列 SEQ ID NO:28 所構成的重鏈可變區及由胺基酸序列 SEQ ID NO:29 所構成的輕鏈可變區的抗體命名為“hPMAb22”。

【0059】 此外，本發明的各抗體可具體地包含：

重鏈可變區，其包含 SEQ ID NO:1 的重鏈 CDR1；SEQ ID NO:2 或 39 的重鏈 CDR2；及 SEQ ID NO:30 的重鏈 CDR3；
及輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO:5 的輕鏈 CDR1；SEQ ID NO:6 的輕鏈 CDR2；及 SEQ ID NO:31 的輕鏈 CDR3；或

SEQ ID NO:32 的重鏈 FR1；SEQ ID NO:9 的重鏈 FR2；
SEQ ID NO:33 的重鏈 FR3；及 SEQ ID NO:34 的重鏈 FR4；
及抗體的輕鏈可變區，其包含 SEQ ID NO:35 的輕鏈 FR1；
SEQ ID NO:14 的輕鏈 FR2；SEQ ID NO:15 的輕鏈 FR3；及
SEQ ID NO:36 的輕鏈 FR4；及更具體地，

重鏈可變區，其包含由 SEQ ID NO:37 所構成的重鏈；
及由 SEQ ID NO:38 所構成的輕鏈可變區，

但是抗體並不限於此等。

【0060】 在本發明的一實施具體例中，將包含由胺基酸序列 SEQ ID NO:37 所構成的重鏈可變區及由胺基酸序列 SEQ ID NO:38 所構成的輕鏈可變區的抗體命名為“20C5”

或“cPMAb205”。

【0061】 在本發明的一特定具體例中，發明者等人已開發結合 PAUF 蛋白質的小鼠抗體(即，2H2 及 20C5)、其嵌合抗體(即，cPMAb22 及 cPMAb205)及其人源化抗體(即，hPMAb22)，且已確認這些抗體以比現有的 PAUF 抗體更高的特異性及親和力結合 PAUF 蛋白質(第 1、3、4 及 8 至 11 圖)。此外，本發明者等人已確認這些抗體可抑制卵巢癌細胞株以及胰臟癌細胞株中的癌細胞，以及衍生自胰臟癌患者之胰臟癌細胞之增殖、遷移及侵入，也可抑制胰臟癌在體內的生長。再者，他們已確認這些抗體的癌症治療效果與 PMAb83 相似或更好，PMAb83 是現有的針對 PAUF 蛋白質的人抗體(第 5 至 7 及 13 至 16 圖)。

【0062】 這些結果意味本發明結合至 PAUF 蛋白質的抗體可有效地使用在需要識別 PAUF 蛋白質的領域，例如，PAUF 蛋白質過度表現的疾病之診斷、治療等。

【0063】 本發明的另一態樣是提供編碼本發明抗體的多核苷酸、含有多核苷酸的表現載體及引入表現載體的轉形體。特別是，抗體的說明係與上文所述相同。

【0064】 本發明中，含有編碼抗體之多核苷酸的表現載體可以是在真核細胞或原核細胞中可複製及/或表現多核苷酸的載體，而真核細胞或原核細胞包含哺乳動物細胞(如，人、猴、兔、大鼠、倉鼠、小鼠等的細胞)、植物細胞、酵母細胞、昆蟲細胞及細菌細胞(如，大腸桿菌(*E.coli*)等)，並且較佳地，可以操作地連接到合適的啟動子，

以便核苷酸可以在宿主細胞中表現，並且含有至少一個可選擇的標記，但是表現載體不特別局限於此。例如，表現載體可以是將多核苷酸導入噬菌體、質體、黏接質體、微小染色體、病毒、反轉錄病毒載體等的形式。

【0065】 含有編碼抗體之多核苷酸的表現載體可以是含有編碼抗體之重鏈或輕鏈之多核苷酸的表現載體，或含有同時編碼重鏈或輕鏈之多核苷酸的表現載體。

【0066】 本發明中，引入表現載體的轉形體可以是經由表現載體的引入而轉形的細胞，包含細菌細胞(如，大腸桿菌 (*E.coli*)、鏈黴菌 (*Streptomyces*)、鼠傷寒沙氏桿菌 (*Salmonella typhimurium*) 等)；酵母細胞；黴菌細胞(如，嗜甲醇酵母菌 (*Pichia pastoris*) 等)；昆蟲細胞(如，果蠅 (*Drosophila*)、夜盜蛾 (*Spodoptera* (Sf9)) 等)；動物細胞(如，中國倉鼠卵巢細胞 (CHO)、COS、小鼠骨髓瘤細胞 (NSO)、293T、bow 黑色素瘤細胞 (bow melanoma cells)、HT-1080、乳倉鼠腎細胞 (BHK)、人胚胎腎細胞 (HEK)、PERC.6 (人視網膜細胞) 等)；及植物細胞，但是轉形體不特別局限於此。

【0067】 如本文所使用，術語“引入”意指將含有編碼抗體之多核苷酸的載體遞送至宿主細胞的方法。引入可經由所屬領域習知的方法諸如磷酸鈣-DNA 共沉澱、DEAE-聚葡萄糖介導的轉染、凝聚胺介導的轉染、電穿孔、顯微注射、脂質體融合、lipofectamine 及原生質體融合而實現。此外，如本文所使用，術語“轉染”意指使用病毒粒子經

由感染的方式將物體送進細胞中。此外，可經由基因槍(gene bombardment)等將載體引入宿主細胞中。本發明中，術語“引入”可與“轉形”互相替代使用。

【0068】 本發明的再另一態樣是提供用於預防或治療癌症的含有抗體的醫藥組成物。

【0069】 該抗體對在癌中過度表現的 PAUF 蛋白質顯示極高之親和力及特異性。該抗體可抑制各種癌(如，胰臟癌、卵巢癌等)之增殖、遷移及侵入，此外，可抑制癌在體內的生長。所以，本發明抗體可有效地使用在諸如癌症等過度表現 PAUF 蛋白質的疾病之預防或治療。特別是，抗體的說明與上文所述相同。

【0070】 如本文所使用，術語“癌”意指由於身體組織的自主過度生長而異常長成的腫塊，其包含能被本發明抗體預防或治療之任何類型的癌，而無限制。癌的具體實例包含胰臟癌、胃癌、結腸癌、膽管癌、食道癌、直腸癌、口腔癌、鼻咽癌、喉癌、肺癌、結腸癌、乳癌、卵巢癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、攝護腺癌、睪丸癌、膀胱癌、腎癌、肝癌、骨癌、結締組織癌、皮膚癌、腦癌、甲狀腺癌、白血病、霍奇金氏症、淋巴瘤及多發性骨髓瘤血癌。

【0071】 如本文所使用，術語“預防”意指經由給予上述組成物而導致抑制或延遲癌症之發作的任何動作，及術語“治療”意指經由給予上述組成物而導致癌症症狀之改善或有利的改變的任何動作。

【0072】醫藥組成物可進一步含有藥學上可接受之載體，而該載體可含有非天然存在的載體。

【0073】如本文所使用，術語“藥學上可接受之載體”意指既不刺激生物體，也不干擾待給予之化合物的生物活性及性質的載體或稀釋劑。作為配製成液體溶液的組成物可接受的藥學載體，可從適合滅菌及體內使用的鹽水、無菌水、林格氏液、緩衝鹽水、白蛋白注射液、葡萄糖溶液、麥芽糊精溶液、甘油、乙醇及其等之混合物中選擇一種或多種混合而使用。如有必要，可添加其他常規添加物諸如抗氧化劑、緩衝液、抑菌劑等。此外，根據本發明的醫藥組成物可進一步添加稀釋劑、分散劑、表面活性劑、黏合劑及潤滑劑，配製成可注射調配劑(如水溶液、懸浮液、乳狀液等)、丸劑、膠囊、顆粒劑及錠劑。

【0074】醫藥組成物可製備成選自錠劑、丸劑、粉劑、顆粒劑、膠囊、懸浮液、溶液、乳狀液、糖漿、無菌水溶液、非水溶劑、懸浮液、冷凍乾燥製劑及栓劑所構成之群組的任何一種調配劑，並且可以是口服或腸外給藥的各種不同調配劑。可使用諸如填充劑、增量劑、黏合劑、保濕劑、崩解劑、表面活性劑等常用的稀釋劑或賦形劑製備調配劑。口服給藥用固體調配劑可包含錠劑、丸劑、粉劑、顆粒劑、膠囊等，這些固體調配劑可以經由添加至少一種賦形劑(如，澱粉、碳酸鈣、蔗糖或乳糖、明膠等)而製備。此外，除簡單的賦形劑外，還可使用潤滑劑(如，硬脂酸鎂、滑石等)。口服給藥用液體調配劑可包含懸浮液、內服用液

體藥物、乳狀液、糖漿等，且除簡單的稀釋劑諸如水及液體石蠟外，還可以使用各種賦形劑諸如保濕劑、甜味劑、香料及防腐劑。腸外給藥的調配劑可包含無菌水溶液、非水溶劑、懸浮液、乳狀液、冷凍乾燥製劑、栓劑等。非水溶劑及懸浮液的實例可包含植物油(如，丙二醇、聚乙二醇及橄欖油)、可注射的酯(如，油酸乙酯)等。栓劑基質可包含 Witepsol、聚乙二醇(macrogol)、Tween 61、可可脂、月桂酸甘油酯(laurinum)、甘油明膠等。

【0075】 可以藥學有效量給予本發明組成物。如本文所使用，術語“藥學有效量”意指以適用於醫療之合理效益/風險比率來治療疾病的足夠量，而有效劑量的高低可根據包含個體種類、疾病嚴重性、年齡、性別、疾病種類、藥物活性、藥物敏感性、給藥時間、給藥途徑及溶出率、治療時間長短的因素，同時組合使用的藥物之因素，以及醫學領域熟知的其他因素而決定。本發明的組成物可作為單獨的治療劑，與其他治療劑組合，或與常規治療劑依序或同時給藥，並可一次或多次給藥。重要的是，考慮到上述所有因素，醫藥組成物應以能得到最大效果且沒有不良作用的最小劑量給藥，而所屬技術領域中具有通常知識者可以很容易地測定該藥學有效量。

【0076】 本發明的具體例中，已確認以高特異性及親和力結合 PAUF 蛋白質的抗體可抑制卵巢癌細胞株以及胰臟癌細胞株中的癌細胞及衍生自胰臟癌患者之胰臟癌細胞之增殖、遷移及侵入，此外，可抑制胰臟癌在體內的生長。

再者，已確認抗體對癌症的治療效果與 PMAb83(即，現有的 PAUF 蛋白質特異性人抗體)相似或更優異(第 5 至 7 及 13 至 16 圖)。

【0077】 這些結果意味本發明能夠結合至 PAUF 蛋白質的抗體可有效地使用於預防或治療癌症。

【0078】 本發明的再另一態樣是提供預防或治療癌症的方法，該方法包含給予個體上文所述的抗體。

【0079】 特別是，抗體、癌、預防及治療的說明係與上文所述相同。

【0080】 如本文所使用，術語“個體”包含已經發展或有發展成癌症風險的哺乳動物(如，大鼠、牛、豬、綿羊、雞、狗、人等)、鳥類等，但是任何癌症可經由給予本發明的醫藥物組成物而治療的個體均包含在內，而無限制。

【0081】 在本發明預防或治療癌症的方法中，給予組成物的給藥途徑及給藥方法並不特別限制，只要組成物能到達目標位點，任何給藥途徑及給藥方法都可使用。

【0082】 具體地，該組成物可以通過各種途徑給藥，包含口服及腸外途徑。給藥途徑的非限制性實例可以包含口服、直腸、局部、靜脈、腹腔內、肌肉內、動脈內、經皮、鼻內、吸入給藥等。此外，組成物可以經由任何能夠將活性藥劑傳遞到目標細胞的裝置來給藥。

【0083】 本發明的再另一態樣是提供抑制癌細胞之增殖、遷移或浸潤的方法，該方法包含給予本發明之抗體。

【0084】 特別是，抗體、個體及癌的說明係與上文所

述相同。

【0085】 該抗體對在癌中過度表現的 PAUF 蛋白質顯示極高之親和力及特異性。該抗體可抑制各種癌(如，胰臟癌、卵巢癌等)之增殖、遷移及侵入，此外，可抑制癌在體內的生長。所以，本發明抗體可有效地使用在預防或治療癌細胞。

【0086】 本發明的再另一態樣是提供其中藥物與本發明之抗體共軛的抗體藥物共軛物。

【0087】 特別是，抗體的說明係與上文所述相同。

【0088】 如本文所使用，術語“抗體藥物共軛物”意指使用目標特異性使藥物與抗體成為共軛形式的物質，在血液循環期間沒有毒性，且抗體的藥物動力學優異。這種抗體藥物共軛物通常包含 3 種組成元素(即，單株抗體-連接基-藥物)，可以經由傳遞藥物至抗體所標靶的細胞而提高抗體的治療效果，特別是癌細胞。

【0089】 如本文所使用，術語“藥物”意指直接或間接與抗體共軛的物質，用於有效地治療抗體有效標靶的疾病。可與抗體共軛的藥物包含放射性核種、藥物、淋巴激素、毒素、雙特異性抗體等。此外，放射性核種的實例可包含 ^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 等，但是放射性核種不限於此。此外，藥物或毒素的實例可包含依託泊苷(etoposide)，替尼泊苷(teniposide)、阿黴素(adriamycin)、柔紅黴素(daunomycin)、洋紅黴素(carminomycin)、胺基蝶呤(aminopterin)、放線菌

素(dactinomycin)、絲裂黴素(mitomycins)、順鉑(*cis*-platinum)及順鉑類似物、博萊黴素(bleomycins)、埃斯黴素(esperamicins)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)、美法侖(melphalan)、氮芥(nitrogen mustard)等，但是可與本發明抗體共軛的藥物或毒素不限於此。

【0090】 可使用所屬領域習知之各種抗體藥物共軛物的製備方法來製備抗體藥物共軛物。

【0091】 本發明的再另一態樣是提供含有本發明抗體的癌症診斷組成物。

【0092】 特別是，抗體及癌的說明係與上文所述相同。

【0093】 本發明的癌症診斷組成物含有可與在各種癌細胞中過度表現的 PAUF 蛋白特異結合的各種抗體，因此本發明的癌症診斷組成物可有效地使用於診斷與 PAUF 蛋白質表現的存在或不存在、或與 PAUF 蛋白質表現量有關的疾病(如，癌症)。

【0094】 本發明的再另一態樣是提供含有該組成物的癌症診斷試劑組。

【0095】 特別是，組成物及癌的說明係與上文所述相同。

【0096】 本發明的癌症診斷試劑組可進一步包括具有一種或多種其他成分的組成物、溶液或適用於分析方法的裝置而構成。

【0097】 本發明的再另一態樣是提供癌症診斷方法，

包含使用本發明抗體的抗原-抗體反應檢測自疑似罹癌的個體中分離的生物樣本中的 PAUF 蛋白質。

【0098】 特別是，抗體、個體及癌的說明係與上文所述相同。

【0099】 因為已知 PAUF 蛋白質在各種癌細胞中過度表現，所以以高特異性及親和力結合至 PAUF 蛋白質的本發明抗體可有效地使用於診斷與 PAUF 蛋白質表現的存在/不存在或與 PAUF 蛋白質表現量有關的疾病(如，癌症)。

【0100】 癌症診斷方法可經由使本發明的 PAUF 特異性抗體與自疑似罹癌的個體分離的生物樣本反應來檢測 PAUF 蛋白質，隨後檢測抗原抗體複合物的形成，從而可診斷癌症。

【0101】 具體地，癌症診斷方法可包含：(a) 以抗體處理自疑似罹癌的個體分離的生物樣本，並通過抗原-抗體反應檢測 PAUF 蛋白質；(b) 比較(a)中檢測到的 PAUF 蛋白質的量與對照組的量，確定 PAUF 蛋白質的量高於對照組時，個體為癌症患者。

【0102】 如本文所使用，術語“生物樣本”可包含組織、細胞、全血、血清、血漿、組織屍體剖檢樣本(腦、皮膚、淋巴結、脊髓等)、細胞培養上清液、破裂的真核細胞、細菌表現系統等，但是生物樣本不限於此。可經由使這些經處置或未經處置的生物樣本與本發明抗體反應來確認 PAUF 蛋白質的存在或癌症的存在。

【0103】 如 本 文 所 使 用 ，

術語“抗原-抗體複合物”意指樣品中 PAUF 蛋白的抗原與識別該抗原的本發明抗體之間的共軛物。抗原-抗體複合物的形成可經由任何方法諸如比色法、電化學法、螢光法、光度法、粒子計數法、目測評估、閃爍計數法等來檢測。然而，檢測抗原-抗體複合物形成的方法並不限於此，且可能有多種應用。

【0104】 可以使用各種標記物來檢測抗原-抗體複合物。標記物的具體實例可包含酶、螢光材料、配體、發光材料、微粒、放射性同位素等，但標記物並不限於此。特別是，可使用作為檢測標記物的酶的實例可包含乙醯膽鹼酯化酶、鹼性磷酸酶、 β -D-半乳糖苷酶、山葵過氧化酶、 β -內醯胺酶等；螢光材料的實例可包含螢光素、 Eu^{3+} 、 Eu^{3+} 螯合物、 Eu^{3+} 穴狀化合物等；配體的實例可包含生物素衍生物等；發光材料的實例可包含吡啶酯類、異流明諾(isoluminol)衍生物等；微粒的實例可包含膠態金、有色膠乳等，及放射性同位素的實例可包含 ^{57}Co 、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{125}I -Bolton Hunter 試劑等。

【0105】 本發明的再另一態樣是提供用來篩選預防或治療癌症的材料之方法，該方法包含：(a) 以預防或治療癌症的候選材料處理癌細胞；(b) 使用本發明抗體測量經候選材料處理之癌細胞中的胰腺癌上調因子(PAUF)蛋白質的量；及(c) 當步驟(b)中的 PAUF 蛋白質的量低於未用候選材料處理的癌細胞之 PAUF 蛋白質的量時，決定在步驟(a)中處理的候選材料是否可以用於作為預防

或治療癌症的材料。

【0106】 特別是，抗體、PAUF 蛋白質及癌的說明係與上文所述相同。

【0107】 如本文所使用，術語“預防或治療癌症的候選材料”是有望治療癌症的材料，任何能夠直接或間接改善(ameliorating)或改進(improving)癌症的材料都可以使用而沒有限制。候選材料包含所有預期使用於治療的材料諸如化合物、基因、蛋白質等。

【0108】 本發明中，可使用所屬領域已知的方法來進行步驟(a)之以預防或治療癌症的候選材料對癌細胞進行處理。具體實施例中，可用候選材料處理癌細胞並一起培養，或將候選材料給予含有癌細胞的生物體而進行處理，但是方法不限於此，且所屬技術領域中具有通常知識者將能夠使用適用於本發明目的的方法。

【0109】 此外，可使用所屬技術領域中具有通常知識者已知的任何方法進行步驟(b)之 PAUF 蛋白質的量的測量。具體實施例中，可使用西方墨點法、免疫共沈澱法、酵素免疫測定法(ELISA)、組織免疫染色法、流式細胞分析等，但是方法不限於此，且所屬技術領域中具有通常知識者將能夠使用適用於本發明目的的方法。

【0110】 最後，步驟(c)涉及決定候選材料是否可以使用作為預防或治療癌症的材料，可降低在癌細胞中過度表現且促進癌細胞的增殖、遷移、侵入、生長等的 PAUF 蛋白質水平的候選材料可使用作為預防或治療癌症

的材料。

[實施例]

【0111】 下文中，將參照以下實施例更詳細地說明本發明。然而，這些實施例僅用於說明性目的，而本發明的範圍不受這些實施例的限制。

【0112】

實施例 1. 抗 PAUF 蛋白質小鼠抗體的發現及確認

實施例 1-1. 2H2 及 20C5 的發現

為了開發靶向 PAUF 蛋白質的抗體，首先使用與 PAUF 蛋白質結合的小鼠單株抗體。

【0113】 具體地，在以下方法中發現抗 PAUF 蛋白質小鼠抗體。將 PAUF 蛋白質注射到小鼠體內後，產生抗 PAUF 蛋白質的抗體，並從小鼠脾臟中分離出 B 淋巴細胞。將分離出的淋巴細胞高倍稀釋，以允許僅一個 B 淋巴細胞進入塗布 PAUF 蛋白質的 96 孔板的各個孔內。然後，使用 HRP 標記的抗小鼠抗體篩選與 PAUF 蛋白質結合的 B 淋巴細胞。

【0114】 結果，發現 4 種抗 PAUF 蛋白質小鼠抗體（即，2H2、4E6、11G6 及 20C5），表 1 及 2 說明重鏈及輕鏈的可變區、CDR 及 FR 的序列。

【0115】

[表 1] 2H2(抗 PAUF 蛋白質小鼠抗體)的胺基酸序列

抗體 名稱	類別	序列	SEQ ID NO
2H2	重鏈可變 區 (V _H)	QVQLKQSGAELVRPGALVKLSCKASGFN IKDYMHVVKQRPEQGLEWIGWIDPEN GNTIYDPKFQGKASITADTSSNTAYLQLS SLTSEDNAVYYCARRAITTATAWFAYWG QGTLVTVSA	17
	V _H -CDR1	GFNIKDYY	1
	V _H -CDR2	IDPENGNT	2
	V _H -CDR3	ARRAITTATAWFA	3
	V _H -CDR3	ARRAITTATAWFAY	4
	V _H -FR1	QVQLKQSGAELVRPGALVKLSCKAS	8
	V _H -FR2	MHWVKQRPEQGLEWIGW	9
	V _H -FR3	IYDPKFQGKASITADTSSNTAYLQLSSLT SEDNAVYYC	10
	V _H -FR4	YWGQGTLVTVSA	11
	V _H -FR4	WGQGTLVTVSA	12
	輕鏈可變 區 (V _L)	DIVMTQSPSSLAVSAGEKV TMSCKSSQSL LNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYW ASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQ AEDLAVYYCKQSYNLYTFGAGTKLELK	18

	V _L -CDR1	QSLNSRTRKNY	5
	V _L -CDR2	WAS	6
	V _L -CDR3	KQSYNLY	7
	V _L -FR1	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSS	13
	V _L -FR2	LAWYQQKPGQSPKLLIY	14
	V _L -FR3	TRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAE DLAVYYC	15
	V _L -FR4	TFGAGTKLELK	16

【 0116】

[表 2] 20C5(抗 PAUF 蛋白質小鼠抗體)的胺基酸序列

抗體 名稱	類別	序列	SEQ ID NO
20C5	重鏈可變 區 (V _H)	QVQLKESGAELVRPGALVKLSCKASGFN IKDYMHVVKQRPEQGLEWIGWIDPEH GNTIYDPKFQGKASLTADTSSNTAYLQL SSLTSEDNAVYYCARRGWLPAWFAYWG QGTLVTVSA	37
	V _H -CDR1	GFNIKDY	1
	V _H -CDR2	IDPEHGNT	39
	V _H -CDR3	ARRGWLPAWFAY	30
	V _H -FR1	QVQLKESGAELVRPGALVKLSCKAS	32

	V _H -FR2	MHWVKQRPEQGLEWIGW	9
	V _H -FR3	IYDPKFQGKASLTADTSSNTAYLQLSSLT SEDNAVYYC	33
	V _H -FR4	WGQGTLVTVSA	34
	輕鏈可變區 (V _L)	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTLSCCKSSQSL LNSRTRKKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYW ASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQ AEDLAVYYCKQSYNLYTFGGGGTKLEIK	38
	V _L -CDR1	QSLNSRTRKNY	5
	V _L -CDR2	WAS	6
	V _L -CDR3	KQSYNLYT	31
	V _L -FR1	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTLSCCKSS	35
	V _L -FR2	LAWYQQKPGQSPKLLIY	14
	V _L -FR3	TRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAE DLAVYYC	15
	V _L -FR4	FGGGGTKLEIK	36

【0117】

實施例 1-2. 確認對 PAUF 蛋白質的特異性

使用下列方法確定在實施例 1-1 中發現的四種抗體 (2H2、4E6、11G6 及 20C5)中，對 PAUF 蛋白質親和力最高的抗體。

【0118】 具體地，以間接 ELISA 法檢測抗原-抗體親和力。用不同濃度的四種抗體 (2H2、4E6、11G6 及 20C5)處理

塗布 PAUF 的免疫板，並使用 HRP 標記的抗小鼠抗體測定 OD 值。特別是，OD 值變高即抗體對 PAUF 的親和力變高。此外，為了測定對 PAUF 蛋白質具有高親和力的抗 PAUF 小鼠單株抗體對其它抗原蛋白質的非特異性結合，在免疫板上塗布 PAUF 及未指定抗原，以進行間接 ELISA。

【0119】 結果，如第 1A 及 1B 圖所示，確認相較於其他抗體，兩種抗體 (2H2 及 20C5) 以較高親和力與 PAUF 蛋白質結合，且兩種抗體 (2H2 及 20C5) 還對 PAUF 蛋白質具有極高的特異性。

【0120】

實施例 1-3. 表位確認

為了確認實施例 1-1 中發現的 2H2 及 20C5 之表位，而確認這些抗體是否具有與 8F3 相同的表位，8F3 是在 KR Patent No.10-1098186 中揭露的 PAUF 特異性人單株抗體 (即，PMAb83)。

【0121】 具體地，進行生物素標記 2H2 的競爭法 ELISA。以 PAUF 塗布免疫板，然後各以 1:0、1:50、1:100 及 1:200 的比例於其中添加生物素標記的 2H2 抗體及非生物素標記的抗體。作為二級抗體，使用鏈黴親和素-HRP 經由測定各抗體的 OD 值而分析表位。特別是，當兩種抗體具有相似的表位時，OD 值隨未標記抗體濃度的增加而減小，然而當兩種抗體的表位彼此不同時，即使未標記抗體濃度增加時，OD 值也未變化。

【0122】 結果，如第 2 圖所示，確認 2H2 或 20C5 可

識別相似的表位，且其各具有不同於 PMAb83 的表位。

【0123】

實施例 2. 製備抗 PAUF 蛋白質嵌合抗體及確認彼等之特性

實施例 2-1. 製備 cPMAb22 或 cPMAb205

為了最小化實施例 1 中發現的小鼠抗體(即，2H2 及 20C5)的排斥作用，製備保留各抗體的可變區，只將其恆定區置換為人源性蛋白質的嵌合抗體。

【0124】 具體地，從產生 2H2 或 20C5 小鼠抗體的融合瘤細胞中分離出總 mRNA，並從中合成 2H2 或 20C5 的 cDNA。然後，通過 PCR 只擴增 2H2 或 20C5 各抗體的重鏈及輕鏈可變區而獲得 2H2 或 20C5 的 DNA。並將通過 PCR 而獲得的 2H2 及 20C5 的各可變區選殖到具有人重鏈及輕鏈恆定區的載體。經由 DNA 電泳而確認選殖到載體的 2H2 及 20C5，進行序列分析並分組。去除具有相同序列的植株後，選擇各抗體的重鏈及輕鏈。在 HEK 293 細胞中表現所選擇的序列，從而最終製備具有小鼠可變區及人恆定區的兩種嵌合抗體。

【0125】 結果，製備了 cPMAb22(即，2H2 的嵌合抗體)及 cPMAb205(即，20C5 的嵌合抗體)。此外，確認這些嵌合抗體的重鏈及輕鏈可變區、CDR 及 FR 序列係與以上表 1 及 2 中所述的 2H2 或 20C5 相同。

【0126】

實施例 2-2. 確認對 PAUF 蛋白質的特異性

使用下列方法確認實施例 2-1 中製備的 cPMAb22 或 cPMAb205 對 PAUF 蛋白質的特異性。

【0127】 具體地，進行間接 ELISA。將嵌合抗體(即，cPMAb22 及 cPMAb205)及人抗體(即，PMAb83)添加至免疫板，免疫板上塗布 PAUF-His 蛋白質及複數種未指定抗原蛋白質，濃度分別為 0 μ g/mL、1 μ g/mL 及 5 μ g/mL，然後用抗人 kappa 輕鏈 HRP(即，二級抗體)測定 OD 值。

【0128】 結果，如第 3 圖所示，確認 cPMAb22 或 cPMAb205 均對 PAUF 蛋白質具有極高特異性，特別是，比 PMAb83(即，現有的抗 PAUF 人抗體)對 PAUF 蛋白質具有更高特異性。

【0129】

實施例 2-3. 確認對 PAUF 蛋白質的親和力

使用下列方法確認實施例 2-1 中製備的 cPMAb22 或 cPMAb205 對 PAUF 蛋白質的特異性。

【0130】 具體地，進行間接 ELISA。於免疫板塗布 PAUF-His 蛋白質並以不同濃度的各抗體處理，使用能識別人抗體恆定區的抗人 FC-HRP 作為二級抗體來分析結果。特別是，隨著各抗體濃度的增加，OD 值增加。

【0131】 結果，如第 4 圖所示，確認 cPMAb22 及 cPMAb205 均對 PAUF 蛋白質具有極高特異性，特別是，比 PMAb83(即，現有的抗 PAUF 人抗體)對 PAUF 蛋白質具有更高特異性。

【0132】

實施例 2-4. 確認對癌細胞增殖的抑制作用

為了確認 cPMAb22(即，實施例 2-1 中製備的嵌合抗體之一)對癌症治療的效果，而確認 cPMAb22 對 BxPC-3(即，胰臟癌細胞株)增殖的抑制作用。

【0133】 具體地，進行 WST-1 增殖檢測。以 3×10^3 細胞/孔的濃度，將具有高度自我表現 PAUF 的 BxPC-3 細胞株添加至 96 孔板中，並以 IgG、cPMAb22(嵌合抗體)及 PMAb83(人抗體)分別以 $15 \mu\text{g/mL}$ 的濃度，每兩天 1 次處理 96 孔板。然後，用 WST-1 處理 96 孔板，在 450 nm 測定吸光度。

【0134】 結果，如第 5 圖所示，確認相較於 IgG 對照抗體處理組，cPMAb22 處理組對 BxPC-3 細胞增殖具有較高抑制能力。

【0135】 從以上結果，確認 cPMAb22 對癌細胞的增殖展現優異的抑制作用，因此 cPMAb22 可作為預防或治療癌症的有效材料。

【0136】

實施例 2-5. 確認對癌細胞遷移的抑制作用

為了確認 cPMAb22(即，實施例 2-1 中製備的嵌合抗體之一)對癌症治療的效果，而確認 cPMAb22 對 CFPAC-1(即，胰臟癌細胞株)及 AMCPAC04(即，衍生自胰臟癌患者之胰臟癌細胞)的遷移之抑制作用。

【0137】 具體地，使用 Transwell 裝置進行遷移檢測。就 CFPAC-1(即，胰臟癌細胞株)而言，將 5×10^4 的細胞添加

到使用無血清培養基的 Transwell 上室，然後以各 $15\ \mu\text{g/mL}$ 濃度的 IgG、cPMAb22 及 PMAb83 處理，並將含血清的培養基添加到 Transwell 的下室。24 小時後觀察細胞遷移情形。此外，就 AMCPAC04(即，衍生自胰臟癌患者之胰臟癌細胞)而言，將 6×10^4 的細胞添加到使用無血清培養基的 Transwell 上室，以各 $10\ \mu\text{g/mL}$ 濃度的 IgG、cPMAb22 及 PMAb83 處理細胞，而將含血清的培養基添加到 Transwell 的下室。20 小時後觀察細胞遷移情形。

【0138】 結果，如第 6 圖所示，確認相較於 IgG 處理組(即，對照組抗體)，cPMAb22 處理組顯示來自胰臟癌細胞株或衍生自胰臟癌患者之胰臟癌的細胞之遷移量明顯降低。特別是，相較於 PMAb83 處理組，其遷移量甚至更低。

【0139】 從這些結果，確認相較於 PMAb83(即，現有的抗 PAUF 人抗體)，cPMAb22 對癌細胞之遷移具有優異抑制作用，因此 cPMAb22 可使用作為預防或治療癌症的有效材料。

【0140】

實施例 2-6. 確認對癌細胞侵入的抑制作用

為了確認 cPMAb22(即，實施例 2-1 中製備的嵌合抗體之一)對癌症治療的效果，而確認 cPMAb22 對 CFPAC-1(即，胰臟癌細胞株)及 AMCPAC04(即，衍生自胰臟癌患者之胰臟癌細胞)的侵入之抑制作用。

【0141】 具體地，以 Transwell 裝置進行侵入檢測。特別是，以可人工模擬細胞外基質的 Matrigel 塗布 Transwell，

觀察因各抗體而變化的胰臟癌細胞株侵入能力。就 CFPAC-1(即，胰腺癌細胞株)而言，將 7×10^4 的細胞添加到使用無血清培養基的 Transwell 上室，然後以各 $15 \mu\text{g/mL}$ 濃度的 IgG、cPMAb22 及 PMAb83 處理，並將含血清的培養基添加到 Transwell 的下室。24 小時後，觀察細胞侵入情形。此外，就 AMCPAC04(即，衍生自胰臟癌患者之胰臟癌細胞)而言，將 6×10^4 的細胞添加到使用無血清培養基的 Transwell 上室，以各 $10 \mu\text{g/mL}$ 濃度的 IgG、cPMAb22 及 PMAb83 處理細胞，而將含血清的培養基添加到 Transwell 的下室。20 小時後，觀察細胞侵入情形。

【0142】 結果，如第 7 圖所示，確認相較於 IgG 處理組(即，對照組抗體)，cPMAb22 處理組顯示來自胰臟癌細胞株或衍生自胰臟癌患者之胰臟癌的細胞之侵入量明顯降低。特別是，確認相較於 PMAb83 處理組，其侵入量甚至更低。

【0143】 從這些結果，確認相較於 PMAb83(即，現有的抗 PAUF 人抗體)，cPMAb22 對癌細胞之侵入具有優異抑制作用，因此 cPMAb22 可使用作為預防或治療癌症的有效材料。

【0144】

實施例 3. 製備抗 PAUF 蛋白質人源化抗體及確認其特性

實施例 3-1. 製備 hPMAb22

為了最小化 2H2(即，實施例 1 中發現的小鼠抗體)及

cPMAb22 (即，實施例 2 中製備的嵌合抗體之一)的排斥作用，而製備人源化抗體，其係保留 2H2 及 cPMAb22(衍生自小鼠)的 CDRs，而 CDRs 以外的可變區及恆定區則被置換為人源性蛋白質。

【0145】 具體地，經由 CDR 移植製備 3 種人源化抗體(即，2H2- V_H1/V_L1 、2H2- V_H1/V_L2 及 2H2- V_H1/V_L3)，並確定其等的親和力及生產收率。為了測定人源化抗體的表現量，三條重鏈(V_H1 、 V_H2 及 V_H3)與三條輕鏈(V_L1 、 V_L2 及 V_L3)間各以 5 mL 量進行交叉組裝，然後將所得物轉染到 HEK293 細胞中。6 天後，收集含有抗體蛋白質的培養基而得到培養液，以西方墨點法測定表現率。此外，經由間接 ELISA 法分析這些抗體的親和力。於免疫板塗布 PAUF-His 並以不同濃度的各抗體處理。使用能識別人抗體恆定區的抗人 Fc-HRP 作為二級抗體來測定 OD 值。

【0146】 結果，如第 8 圖所示，相較於其他人源化抗體，2H2- V_H1/V_L1 抗體對 PAUF 蛋白質具有最高親和力，因此確認相較於 cPMAb22(即，嵌合抗體)或 PMAb83(即，現有的抗 PAUF 人抗體)，2H2- V_H1/V_L1 抗體甚至具有更高的親和力。

【0147】 此外，如第 9 圖所示，2H2- V_H1/V_L1 抗體的生產收率為 165.5 mg/L，因此確認 2H2- V_H1/V_L1 抗體的生產收率顯著高於 2H2- V_H1/V_L2 抗體(28.25 mg/L)或 2H2- V_H1/V_L3 抗體(42.0 mg/L)。

【0148】 從這些結果，根據本發明，選擇對 PAUF 蛋

白質親和力最高及生產收率最高的 2H2-V_H1/V_L1 抗體作為 2H2 及 cPMAB 22 的人源化抗體，命名為“hPMAb22”，以下表 3 說明其序列。

【0149】

[表 3] hPMAb22(即，抗 PAUF 蛋白質人源化抗體)的胺基酸序列

抗體名稱	類別	序列	SEQ ID NO
hPM Ab22	重鏈可變區 (V _H)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGF NIKDY YMHWVRQAPGQGLEWMGWIDP ENGNTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYYCARRAITTATAW FAYWGQGTLVTVSS	28
	V _H -CDR1	GFNIKDY Y	1
	V _H -CDR2	IDPENGNT	2
	V _H -CDR3	ARRAITTATAWFA	3
	V _H -CDR3	ARRAITTATAWFAY	4
	V _H -FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	19
	V _H -FR2	MHWVRQAPGQGLEWMGW	20
	V _H -FR3	NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRL RSDDTAVYYC	21
	V _H -FR4	YWGQGTLVTVSS	22

	V _H -FR4	WGQGTLVTVSS	23
	輕鏈可變區 (V _L)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSL LNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQ AEDVAVYYCKQSYNLYTFGQGTKVEIK	29
	V _L -CDR1	QSLNSRTRKNY	5
	V _L -CDR2	WAS	6
	V _L -CDR3	KQSYNLY	7
	V _L -FR1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS	24
	V _L -FR2	LAWYQQKPGQPPKLLIY	25
	V _L -FR3	TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAE DVAVYYC	26
	V _L -FR4	TFGQGTKVEIK	27

【0150】

3-2. 確認對 PAUF 蛋白質的特異性

使用實施例 2-2 的方法確認 hPMAb22(即，實施例 3-1 中製備的人源化抗體)對 PAUF 蛋白質的特異性。

【0151】 結果，如第 10 圖所示，確認 hPMAb22 對 PAUF 蛋白質具有顯著高特異性，特別是，甚至比 PMAb83(即，現有的抗 PAUF 人抗體)更高的特異性。

【0152】

實施例 3-3. 確認對 PAUF 蛋白質的親和力

使用實施例 2-2 的方法確認 hPMAb22(即，實施例 3-1 中製備的人源化抗體)對 PAUF 蛋白質的親和力。

【0153】 具體地，以 SPR 法測定抗原-抗體結合親和力，將抗原 PAUF 固定在金屬薄膜表面，以不同濃度稀釋抗體，使抗體通過金屬表面。經由測定抗原及抗體間的結合及解離所需的時間而測定抗原-抗體結合親和力。

【0154】 結果，如第 11 圖所示，確認 PAMb83 具有 1.169×10^{-9} M 的 K_d 值及 hPMAb22 具有 0.1938×10^{-9} M 的 K_d 值。從這些結果，確認 hPMAb22 明顯具有對 PAUF 蛋白質的高親和力，特別是，相較於 PMAb83(即，現有的抗 PAUF 人抗體)更高的親和力。

【0155】

實施例 3-4. 表位確認

為了確認實施例 3-1 中製備的 hPMAb22 的表位，首先根據實施例 1-3 確認 PMAb83(即，現有的抗 PAUF 人抗體)及表位是否相同。

【0156】 結果，如第 12 圖所示，確認 hPMAb22 具有與 PMAb83 不同的表位。

【0157】

實施例 3-5. 確認癌細胞增殖的抑制作用

為了確認 hPMAb22(即，實施例 3-1 中製備的人源化抗體)對癌症治療的效果，根據實施例 2-4 的方法確認 hPMAb22 對 CFPAC-1(即，胰臟癌細胞株)增殖的抑制作用。

【0158】 結果，如第 13 圖所示，確認相較於 IgG 處理組(即，對照組抗體)，hPMAb22 處理組對 CFPAC-1(即，胰

臟癌細胞株)的增殖具有優異抑制作用。

【0159】 從這些結果，確認 hPMAb22 對癌細胞的增殖展現優異抑制作用，因此 hPMAb22 可使用作為預防或治療癌症的有效材料。

【0160】

實施例 3-6. 確認對癌細胞遷移的抑制作用

為了確認 hPMAb22(即，實施例 3-1 中製備的人源化抗體)對癌症治療的效果，而根據實施例 2-5 的方法確認 hPMAb22 對 AMCPAC06(即，衍生自胰臟癌患者之胰臟癌細胞)及 OVCAR-5(即，卵巢癌細胞株)遷移的抑制作用。

【0161】 結果，如第 14 圖所示，相較於 IgG 處理組(即，對照組抗體)，hPMAb22 處理組顯示胰臟癌細胞株、衍生自胰臟癌患者之癌細胞株及卵巢癌細胞株的遷移量明顯降低。特別是，這些結果確認經由 hPMAb22 處理的降低的遷移量甚至比 PMAb83 處理組所降低的還要低。

【0162】 從這些結果，確認相較於 PMAb83(即，現有的抗 PAUF 人抗體)，hPMAb22 展現對癌細胞遷移的優異抑制作用，因此 hPMAb22 可使用作為預防或治療癌症的有效材料。

【0163】

實施例 3-7. 確認對癌細胞侵入的抑制作用

為了確認 hPMAb22(即，實施例 3-1 中製備的人源化抗體)對癌症治療的效果，而根據實施例 2-6 的方法確認 hPMAb22 對 AMCPAC04 或 AMCPAC06(即，衍生自胰臟癌

患者之胰臟癌細胞)及 OVCAR-5(即，卵巢癌細胞株)侵入的抑制作用。

【0164】 結果，如第 15 圖所示，相較於 IgG 處理組(即，對照組抗體)，hPMAb22 處理組顯示胰臟癌細胞株、衍生自胰臟癌患者之癌細胞株及卵巢癌細胞株的侵入量明顯降低。特別是，這些結果確認經由 hPMAb22 處理的降低的侵入量甚至比 PMAb83 處理組所降低的還要低。

【0165】 從這些結果，確認相較於 PMAb83(即，現有的抗 PAUF 人抗體)，hPMAb22 展現對癌細胞侵入的優異抑制作用，因此 hPMAb22 可使用作為預防或治療癌症的有效材料。

【0166】

實施例 3-8. 確認體內抗癌作用

由於實施例 3-5 至 3-7 已證實對 PAUF 蛋白質具特異性的人源化抗體 hPMAb22 抑制癌細胞的體外增殖、遷移及侵入，因此測試 hPMAb22 在體內是否也展現同樣的抗癌作用。

【0167】 具體地，將胰腺導管腺癌患者的癌組織移植到各 NSG 小鼠體內，製備人源性異種移植(PDX)模型。將 PDX-小鼠模型取出的癌組織皮下移植到各裸鼠右腿。約 3 星期後，選取具有大小為 80 mm^3 至 120 mm^3 腫瘤的小鼠並分組。小鼠經由尾靜脈注射給藥。IgG 及 hPMAb22 按劑量 10 mg/kg 給藥，每星期 2 次，共 4 星期，及作為正向對照組的 Gemzar[®](吉西他濱)，按 50 mg/kg 的劑量給藥一次。

特別是，每星期 2 次用測徑器測量腫瘤大小，並測量每隻小鼠的體重，以測定腫瘤對藥物的反應。在第 31 天結束實驗後，將腫瘤切除，並測量及比較各腫瘤的重量。

【0168】 結果，如第 16 圖所示，確認相較於對照組抗體處理的組別，hPMAb22 處理組顯示癌細胞生長下降 30% 或更多。特別是，確認 hPMAb22 對生長抑制作用比給予使用作為抗癌劑的 Gemzar[®]的組別更為優異。

【0169】 從這些結果，確認相對於 Gemzar[®](即，現有的抗癌劑)，hPMAb22 展現對癌細胞在體內生長的優異抑制作用，因此 hPMAb22 可使用作為預防或治療癌症的有效材料。

【0170】 從以上所述，本發明所屬技術領域具有通常知識者將能夠理解本發明可以其他特定形式體現，而無需修改本發明的技術概念或基本特徵。在這方面，本文所披露的示例性具體例僅用於說明性目的，不應被解釋為限制本發明的範圍。相反地，本發明的目的不僅涵蓋示例性具體例，而且還涵蓋可包含在如所附權利要求所界定的本發明的精神及範圍內的各種選擇形式、修改形式、等價形式及其他具體例。

【符號說明】

【0171】

無。

【序 列 表】

- <110> 東亞大學校產學協力團
普雷斯蒂生物製藥私人有限公司
- <120> 特異性結合至 PAUF 蛋白質的抗體及其用途
- <150> 10-2017-0096370
<151> 2017-07-28
- <160> 38
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 2H2, 20C5 和 hPMAb22 的 VH-CDR1
- <400> 1
Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr
1 5
- <210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 2H2, 20C5 和 hPMAb22 的 VH-CDR2
- <400> 2
Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asn Thr
1 5
- <210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 2H2 和 hPMAb22 的 VH-CDR3
- <400> 3
Ala Arg Arg Ala Ile Thr Thr Ala Thr Ala Trp Phe Ala
1 5 10
- <210> 4
<211> 14
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 2H2 和 hPMAb22 的 VH-CDR3

<400> 4
Ala Arg Arg Ala Ile Thr Thr Ala Thr Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 2H2, 20C5 和 hPMAb22 的 VL-CDR1

<400> 5
Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 6
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 2H2, 20C5 和 hPMAb22 的 VL-CDR2

<400> 6
Trp Ala Ser
1

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 2H2 和 hPMAb22 的 VL-CDR3

<400> 7
Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Tyr
1 5

<210> 8
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 2H2 的 VH-FR1

<400> 8
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 2H2 和 20C5 的 VH-FR2

<400> 9
Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10 15
Trp

<210> 10
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 2H2 的 VH-FR3

<400> 10
Ile Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr
1 5 10 15
Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
20 25 30
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 2H2 的 VH-FR4

<400> 11
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

1	5	10
<210>	12	
<211>	11	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	2H2 的 VH-FR4	
<400>	12	
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala		
1	5	10
<210>	13	
<211>	26	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	2H2 的 VL-FR1	
<400>	13	
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly		
1	5	10 15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser		
	20	25
<210>	14	
<211>	17	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	2H2 和 20C5 的 VL-FR2	
<400>	14	
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile		
1	5	10 15
Tyr		
<210>	15	
<211>	36	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	2H2 和 20C5 的 VL-FR3	

<400> 15
Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 2H2 的 VL-FR4

<400> 16
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
1 5 10

<210> 17
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 2H2 的 VH

<400> 17
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Ala Ile Thr Thr Ala Thr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 18
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 2H2 的 VL

<400> 18
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95
Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 19
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPMab22 的 VH-FR1

<400> 19
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> hPMAb22 的 VH-FR2

<400> 20
Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10 15

Trp

<210> 21
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPMAb22 的 VH-FR3

<400> 21
Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr
1 5 10 15

Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 22
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPMAb22 的 VH-FR4

<400> 22
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPMAb22 的 VH-FR4

<400> 23
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 24
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPMAb22 的 VL-FR1

<400> 24
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser
20 25

<210> 25
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPMAb22 的 VL-FR2

<400> 25
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 26
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPMAb22 的 VL-FR3

<400> 26
Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPMAb22 的 VL-FR4

<400> 27
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 28
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPMAb22 的 VH

<400> 28
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg Ala Ile Thr Thr Ala Thr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 29
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hPMAb22 的 VL

<400> 29
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95
Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 30
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 20C5 的 VH-CDR3

<400> 30
Ala Arg Arg Gly Trp Leu Pro Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 20C5 的 VL-CDR3

<400> 31
Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr
1 5

<210> 32
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 20C5 的 VH-FR1

<400> 32
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 33
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 20C5 的 VH-FR3

<400> 33
Ile Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Leu Thr Ala Asp Thr
1 5 10 15

Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 20C5 的 VH-FR4

<400> 34
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
1 5 10

<210> 35
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 20C5 的 VL-FR1

<400> 35
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser
20 25

<210> 36
<211> 10
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 20C5 的 VL-FR4

<400> 36

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 37

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 20C5 的 VH

<400> 37

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu His Gly Asn Thr Ile Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Ser Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Gly Trp Leu Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 38

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 20C5 的 VL

<400> 38

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 39
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH-CDR2 of 20C5

<400> 39
Ile Asp Pro Glu His Gly Asn Thr
1 5

申請專利範圍

1. 一種結合至胰腺癌上調因子(PAUF)蛋白質之抗體，包括：

重鏈可變區，係包括 SEQ ID NO:1 的重鏈 CDR1；SEQ ID NO:2 或 39 的重鏈 CDR2；及 SEQ ID NO:3、4 或 30 的重鏈 CDR3；及

輕鏈可變區，係包括 SEQ ID NO:5 的輕鏈 CDR1；SEQ ID NO:6 的輕鏈 CDR2；及 SEQ ID NO:7 或 31 的輕鏈 CDR3。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之抗體，其中：

該抗體的重鏈可變區包括 SEQ ID NO:8、19 或 32 的重鏈 FR1；SEQ ID NO:9 或 20 的重鏈 FR2；SEQ ID NO:10、21 或 33 的重鏈 FR3；及 SEQ ID NO:11、12、22、23 或 34 的重鏈 FR4；及

該抗體的輕鏈可變區包括 SEQ ID NO:13、24 或 35 的輕鏈 FR1；SEQ ID NO:14 或 25 的輕鏈 FR2；SEQ ID NO:15 或 26 的輕鏈 FR3；及 SEQ ID NO:16、27 或 36 的輕鏈 FR4。

3. 如申請專利範圍第 1 項所述之抗體，其中：

該重鏈可變區係由胺基酸序列 SEQ ID NO:17、28 或 37 所構成；及

該輕鏈可變區係由胺基酸序列 SEQ ID NO:18、29 或 38 所構成。

4. 一種多核苷酸，該多核苷酸編碼申請專利範圍第 1 項

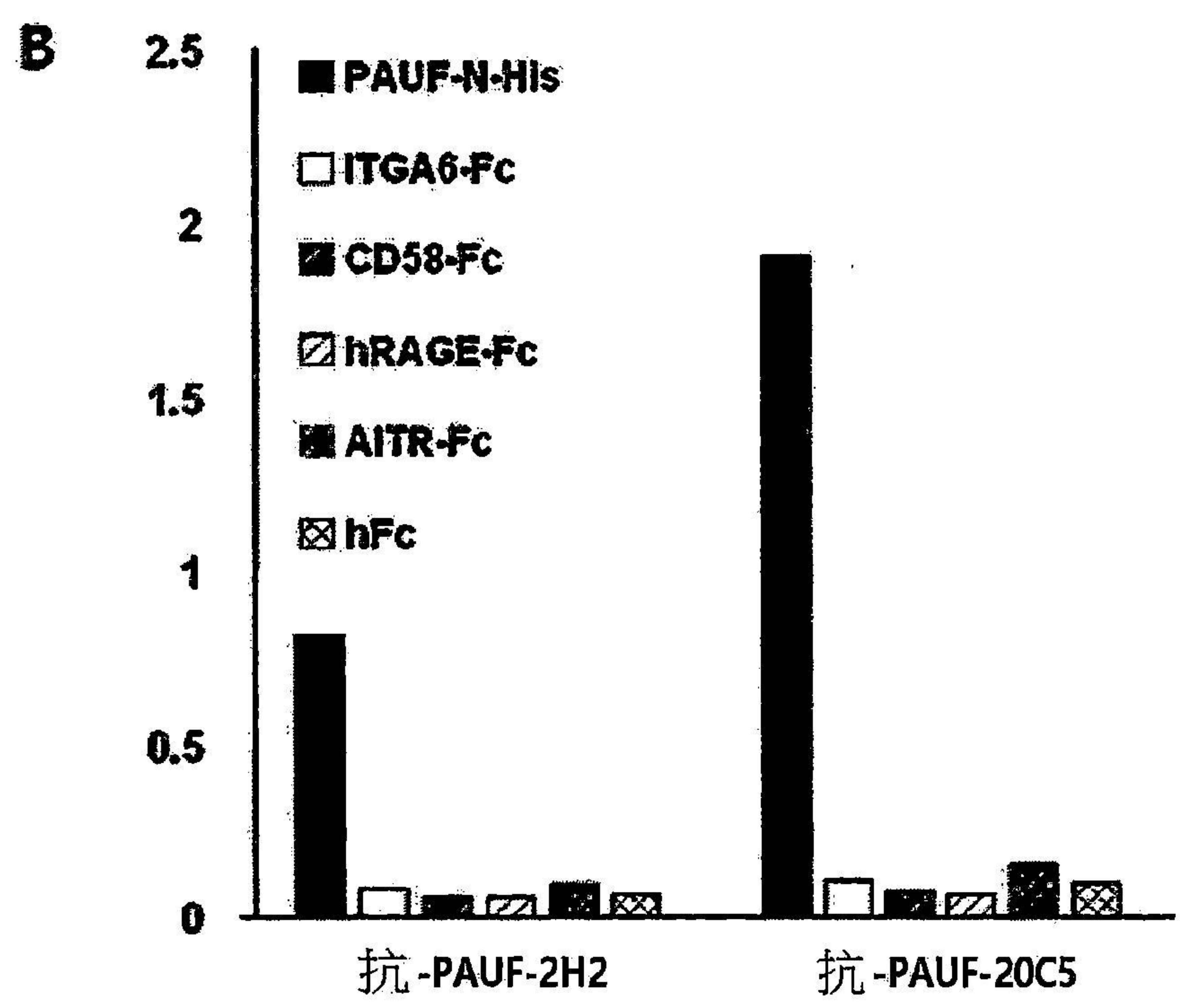
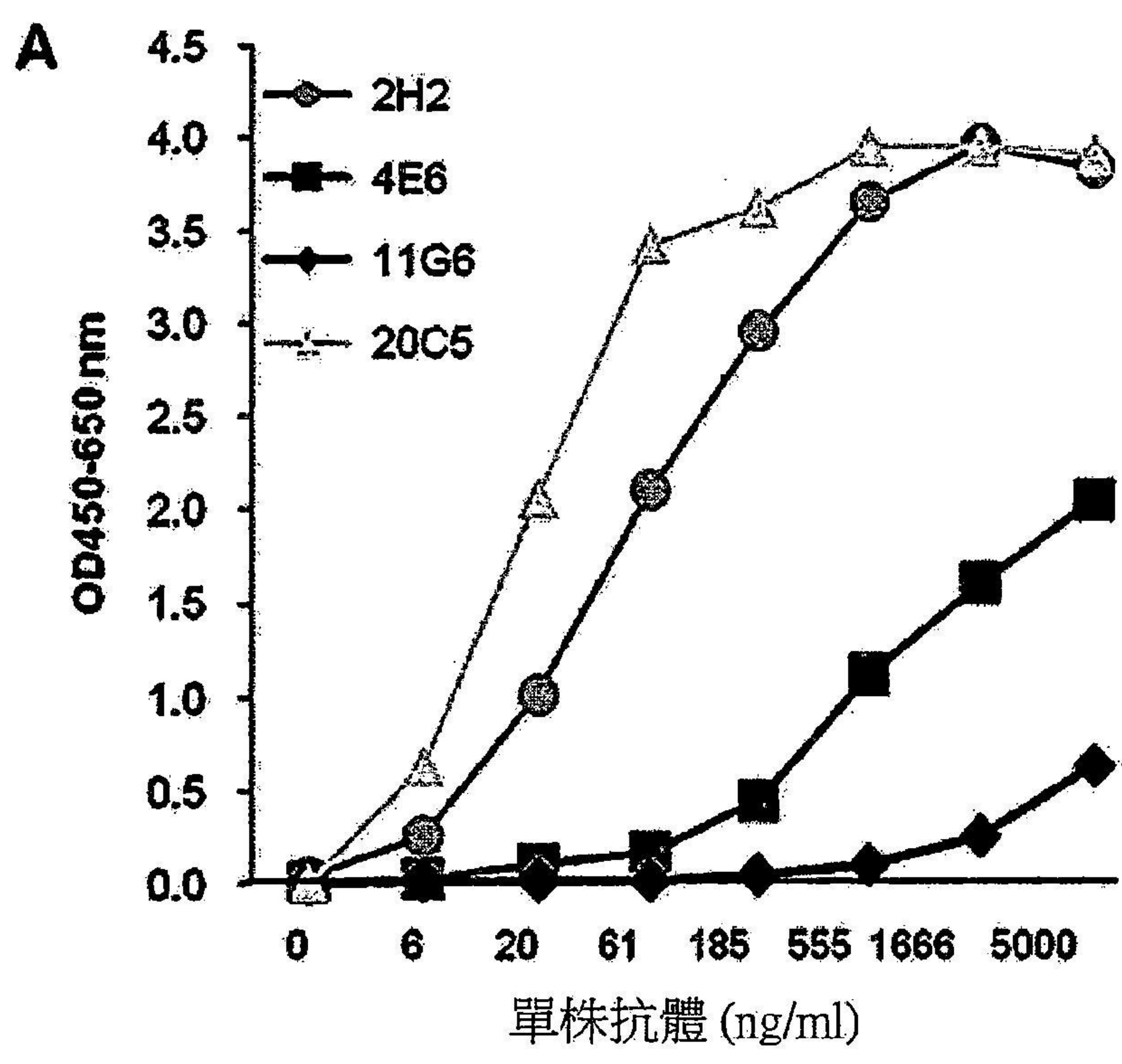
至第 3 項中任一項所述之抗體。

5. 一種表現載體，該表現載體包括申請專利範圍第 4 項所述之多核苷酸。
6. 一種轉形體，係引入申請專利範圍第 5 項所述之表現載體。
7. 一種用於預防或治療癌症的醫藥組成物，係包括申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項所述之抗體。
8. 一種如申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項所述之抗體於製備用於預防或治療癌症的藥劑之用途。
9. 一種如申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項所述之抗體於製備用於抑制癌細胞之增殖、遷移或侵入的藥劑之用途。
10. 一種抗體-藥物共軛物，其中藥物係與申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項所述之抗體共軛。
11. 一種癌症診斷組成物，該組成物包括申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項所述之抗體。
12. 一種癌症診斷試劑盒，該試劑盒包括申請專利範圍第 11 項所述之組成物。
13. 一種癌症診斷方法，該方法包括使用申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項所述之抗體，經由抗原-抗體反應而檢測自疑似罹癌個體分離出的生物樣品中的胰腺癌上調因子(PAUF)蛋白質。
14. 一種篩選用於預防或治療癌症之材料的方法，包括：
 - (a) 以預防或治療癌症的候選材料處理癌細胞；

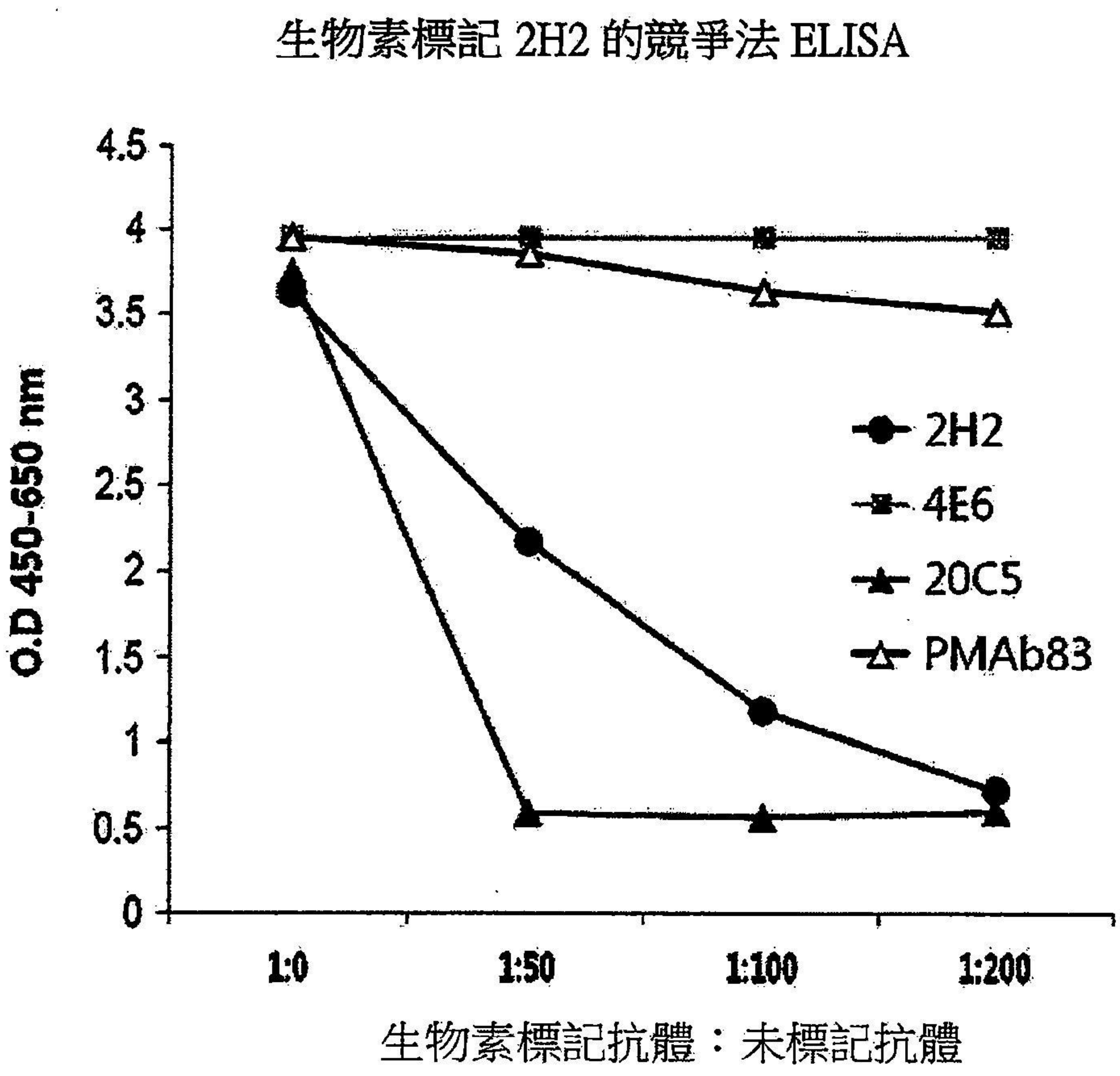
(b) 使用申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項所述之抗體測量經候選材料處理之癌細胞中的胰腺癌上調因子(PAUF)蛋白質的量；及

(c) 當步驟(b)中的 PAUF 蛋白質的量低於未用候選材料處理的癌細胞之 PAUF 蛋白質的量時，決定在步驟(a)中處理的候選材料是否可以使用作為預防或治療癌症的材料。

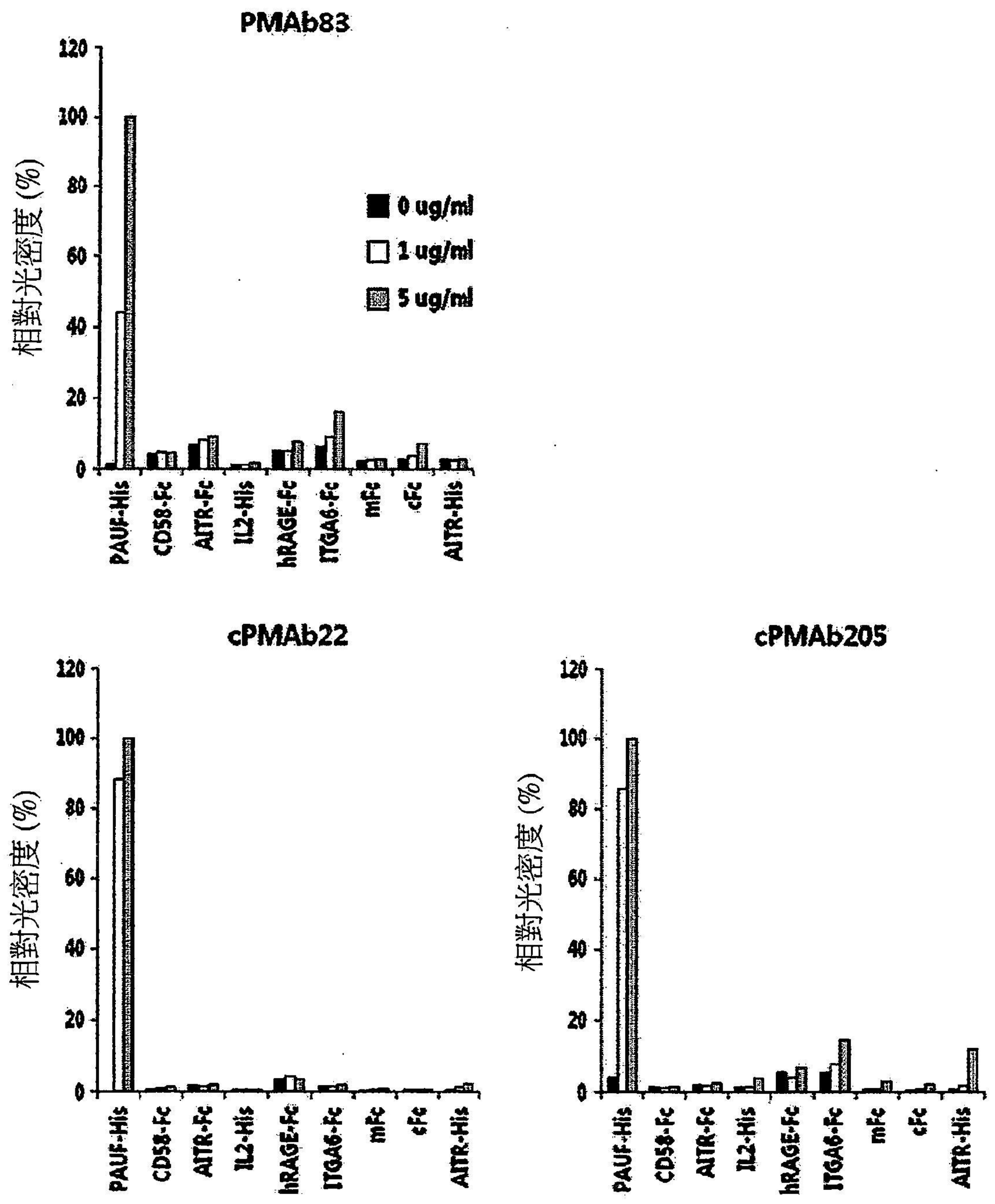
【發明圖式】



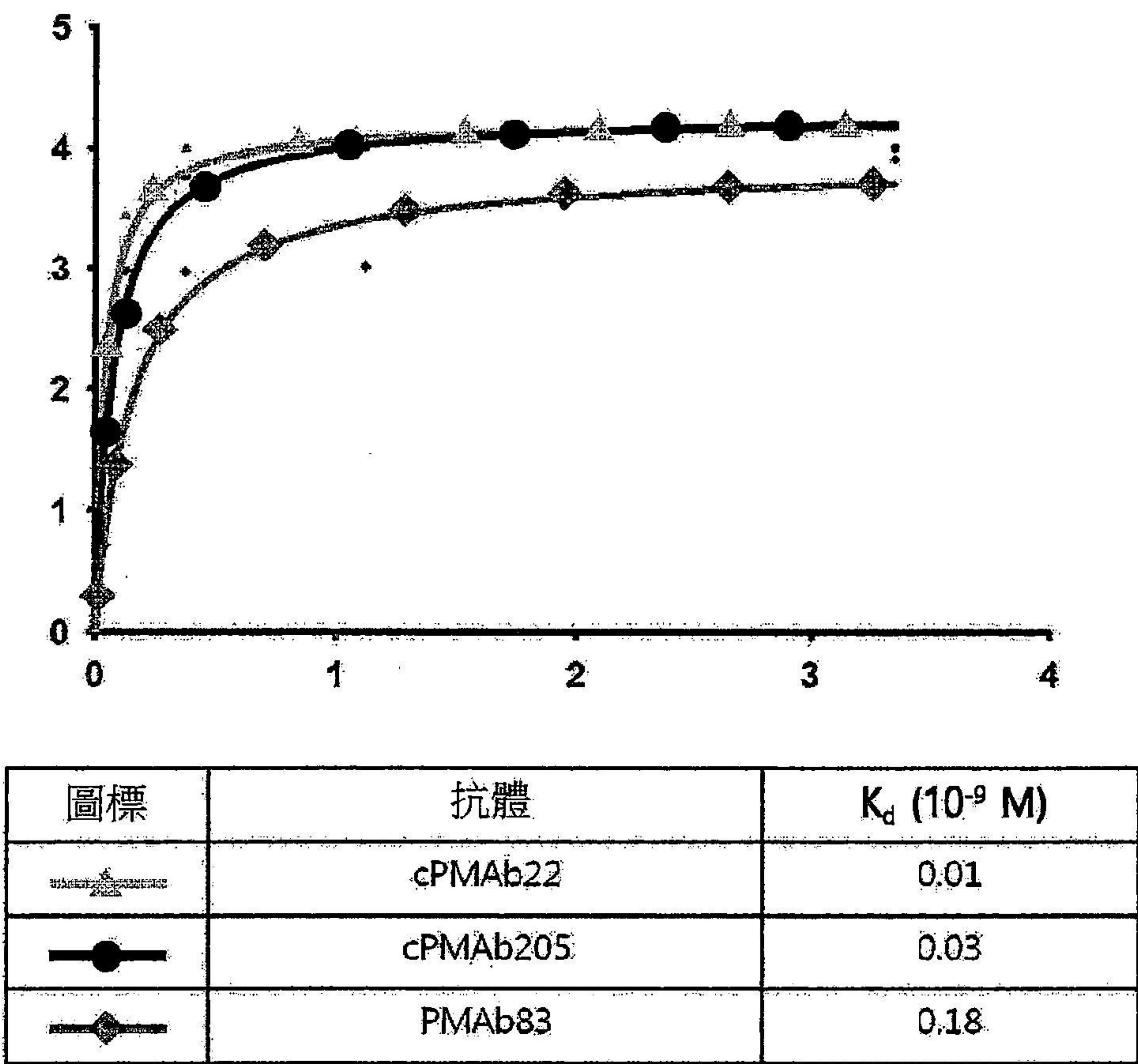
【第1圖】



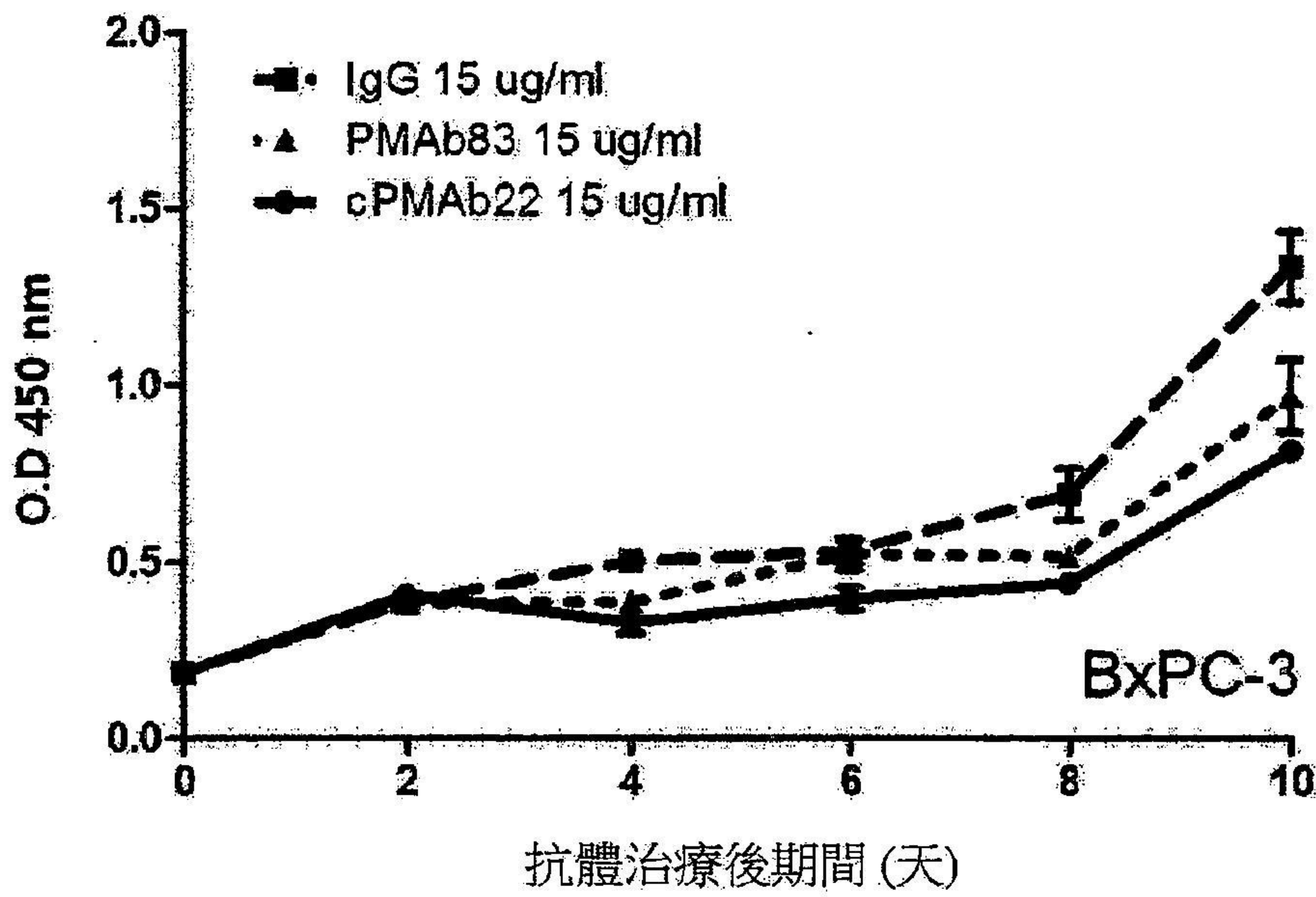
【第2圖】



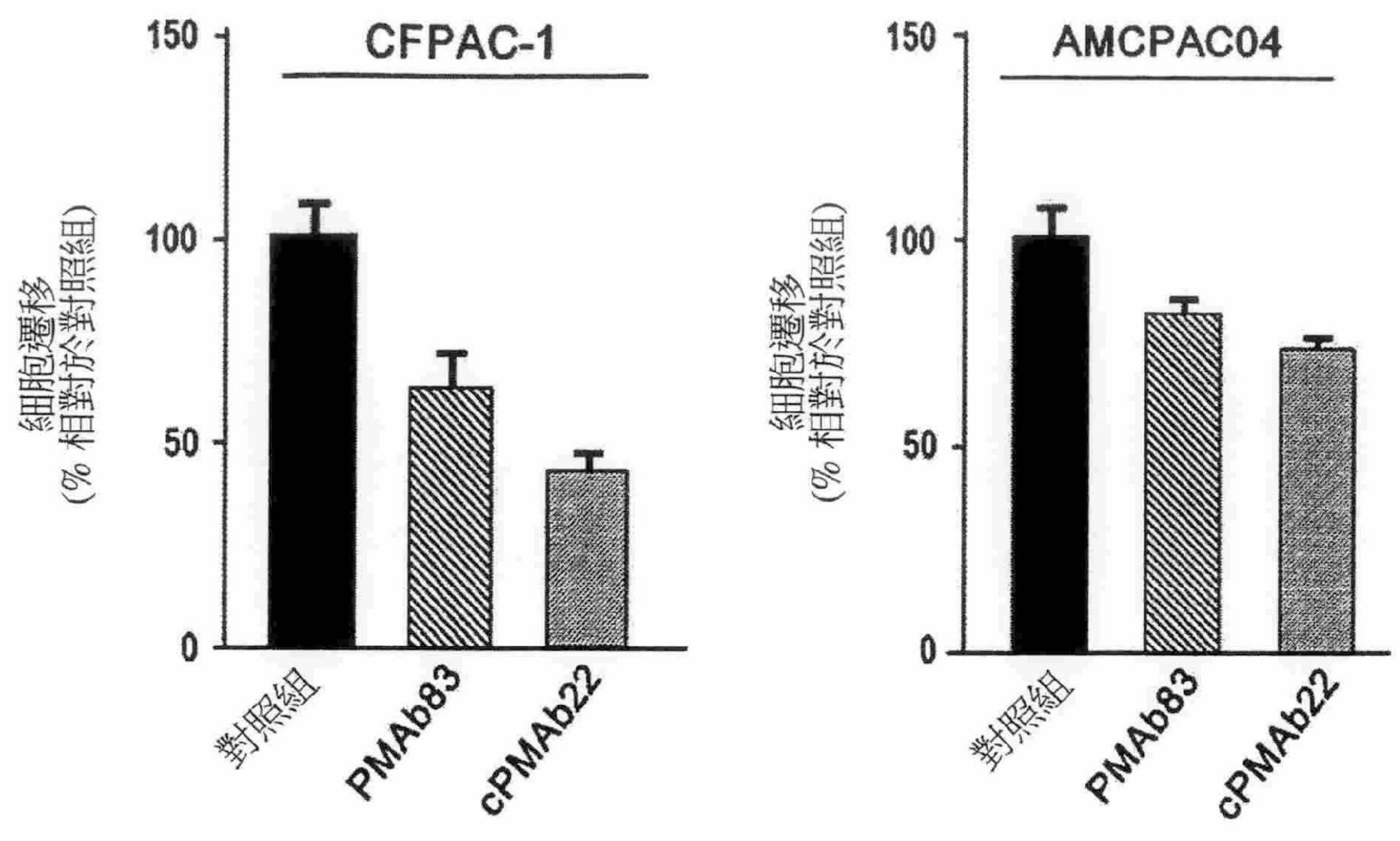
【第3圖】



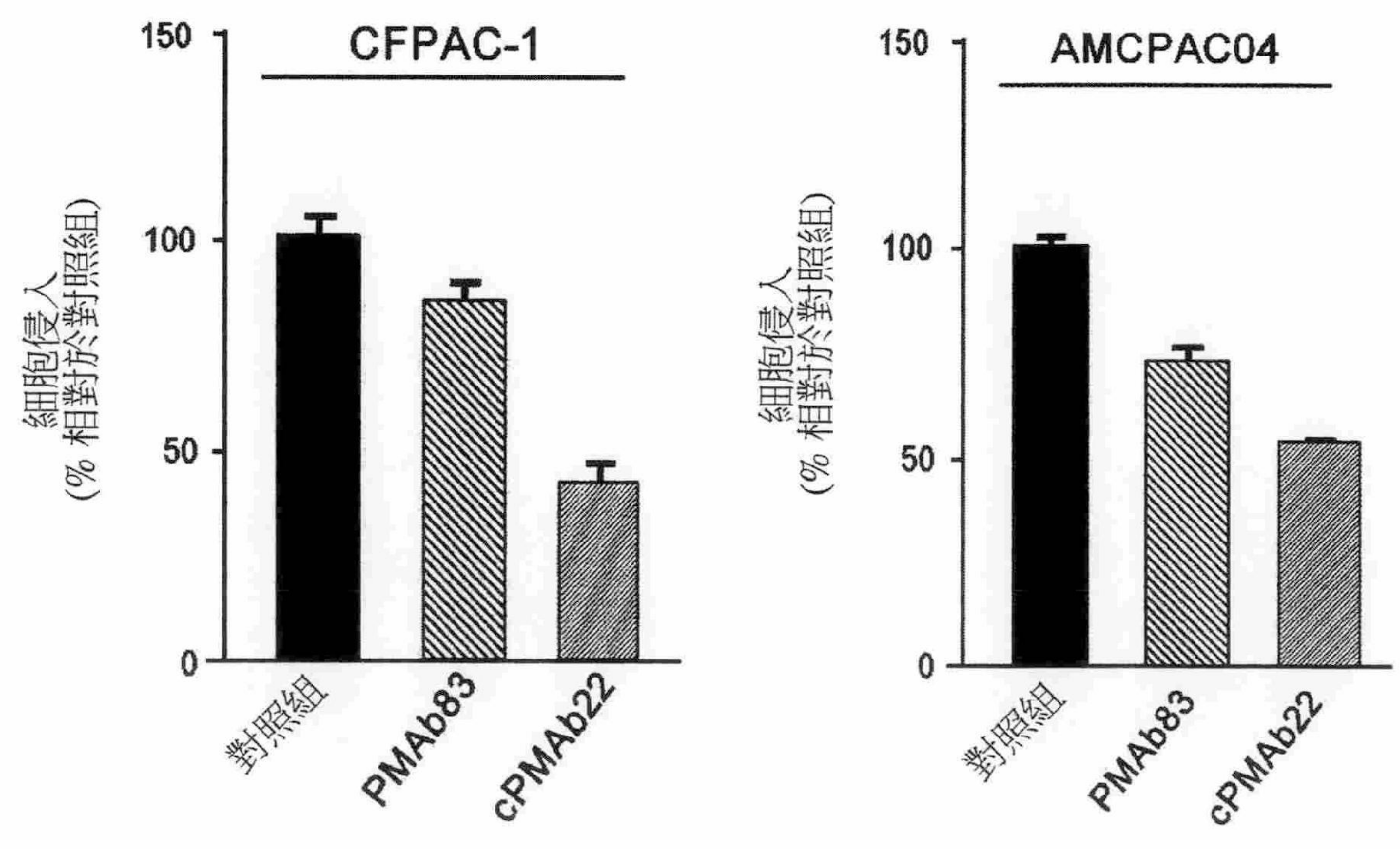
【第4圖】



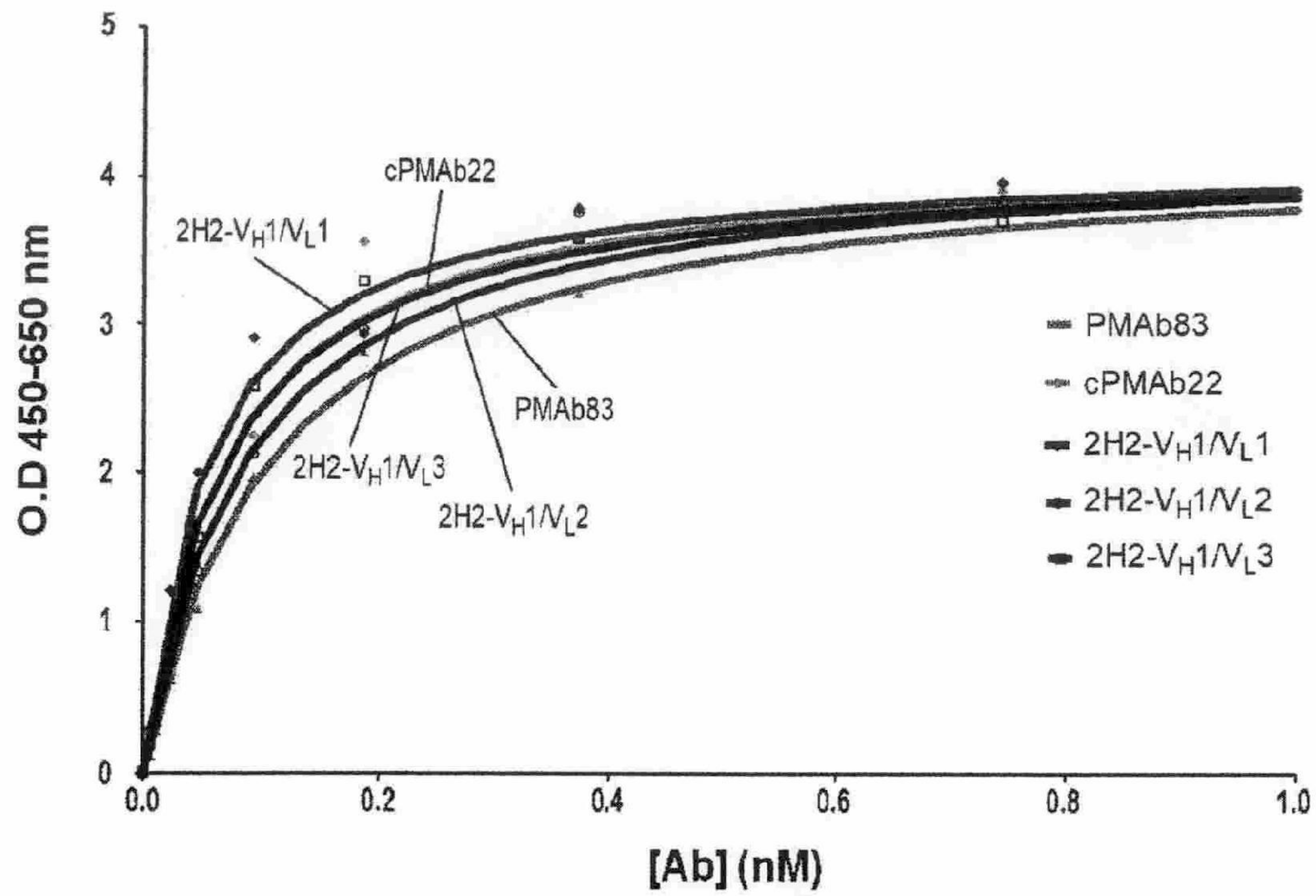
【第5圖】



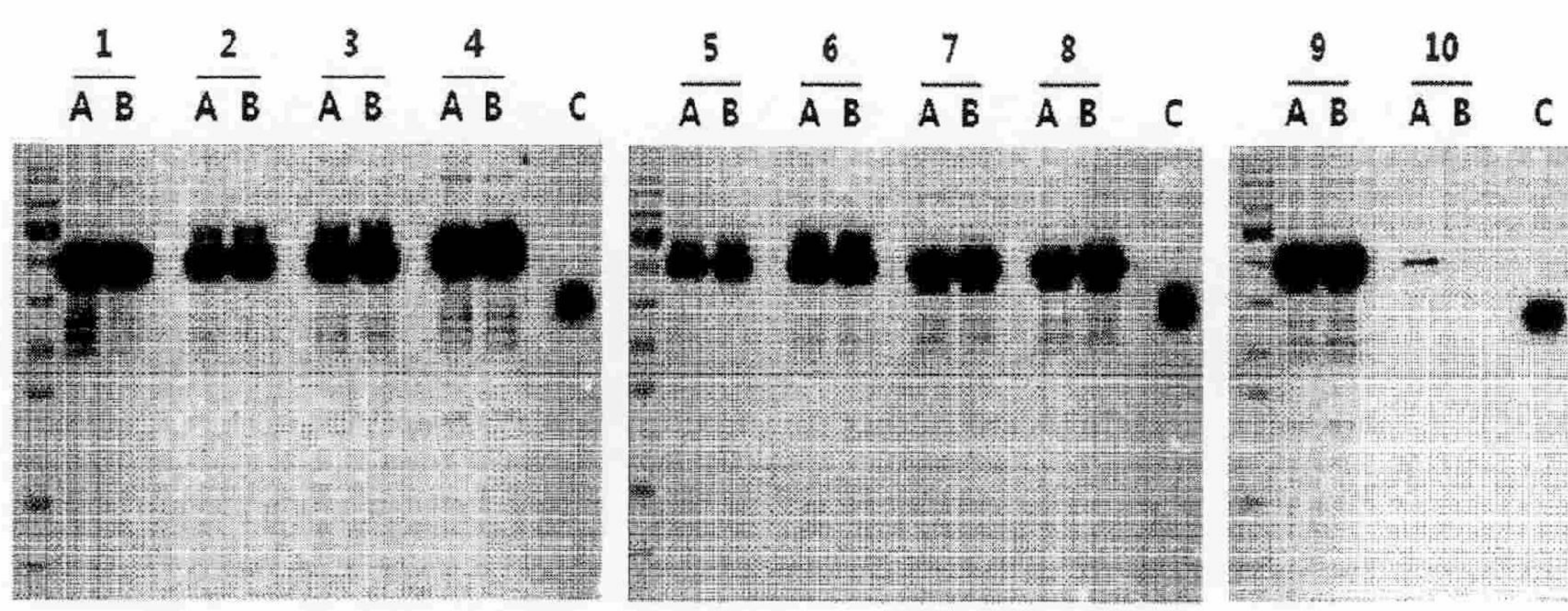
【第6圖】



【第7圖】



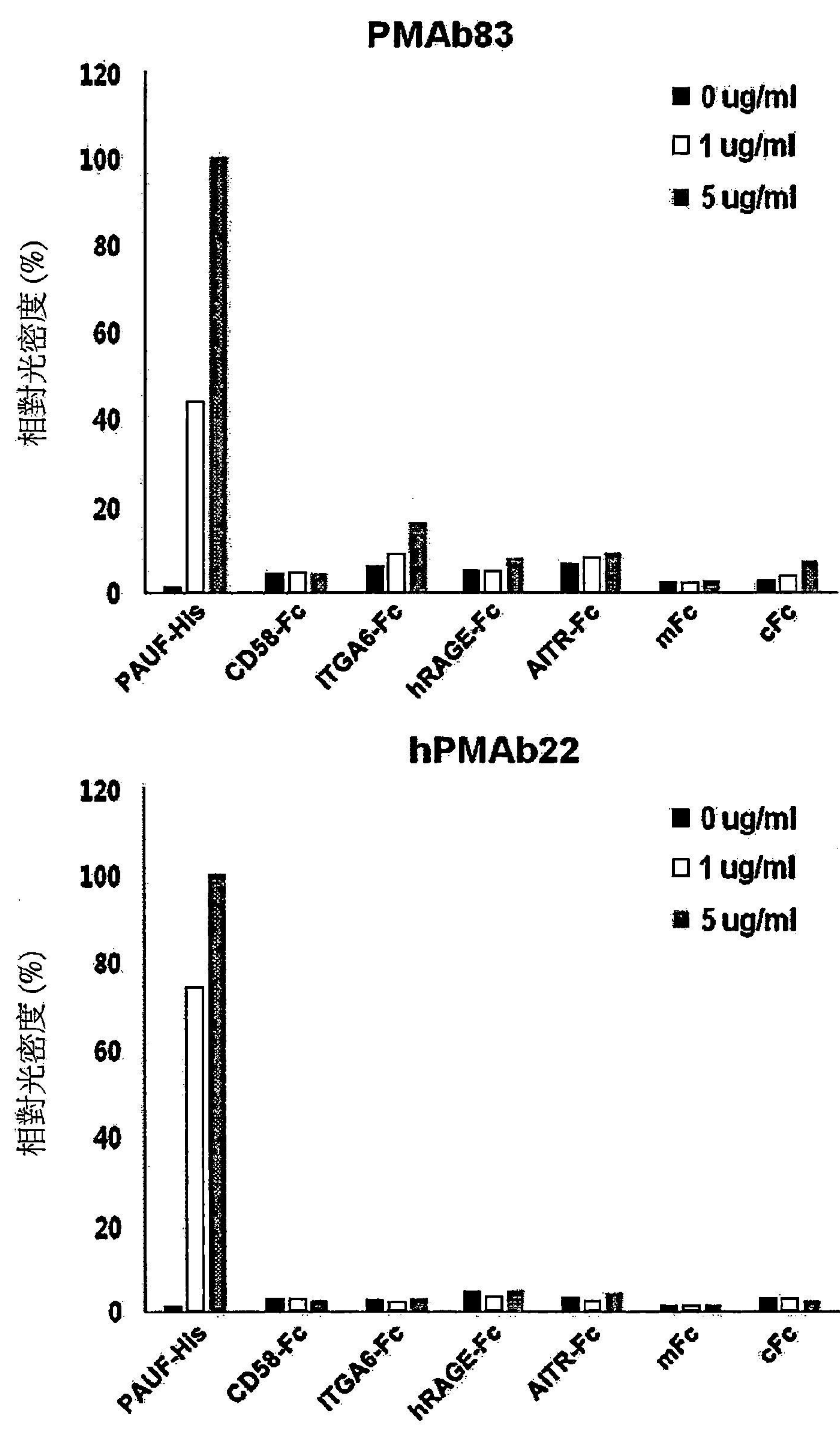
【第8圖】



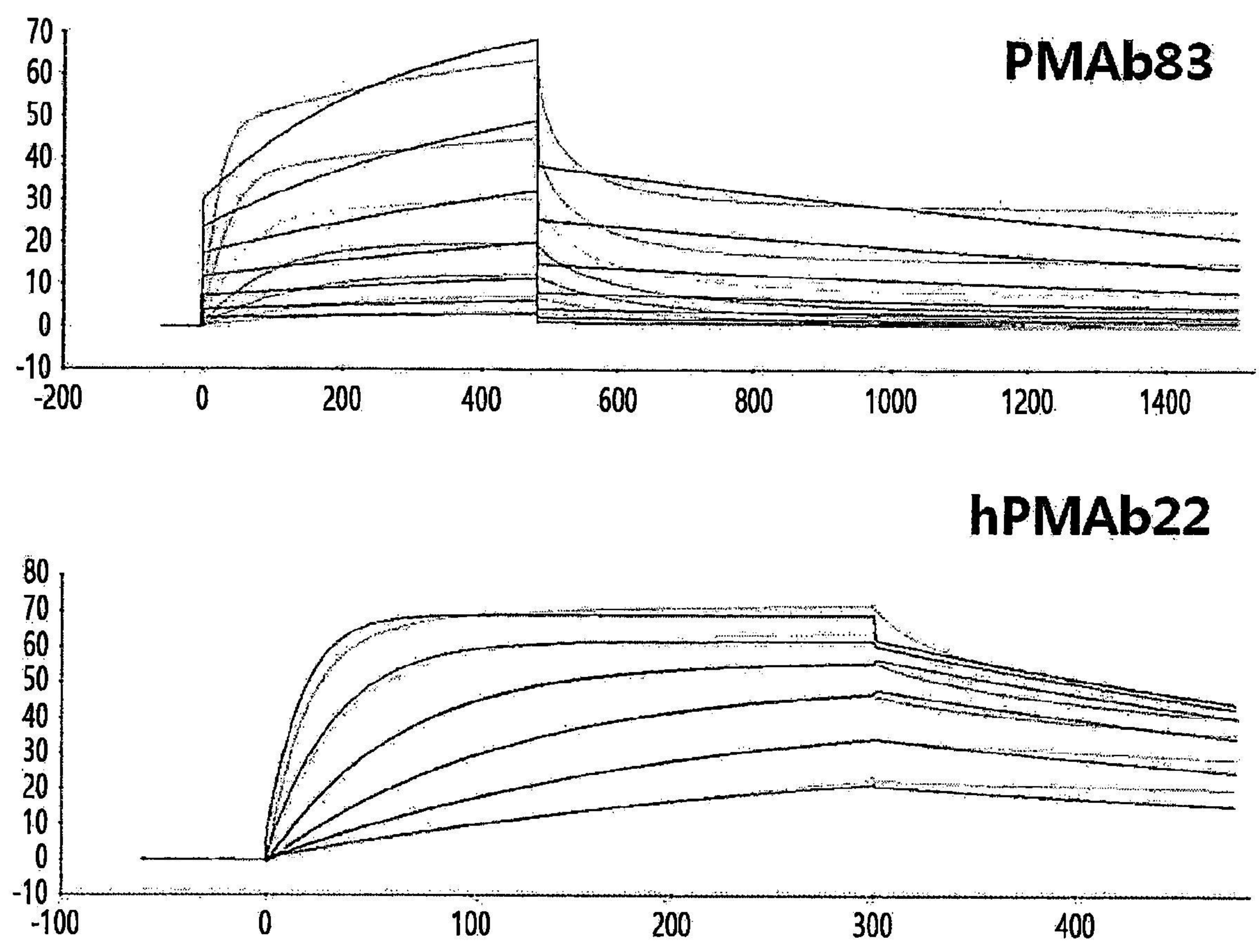
► 收率

- 1 : 2H2-V_H1-V_L1 : 165.5 mg/L
- 2 : 2H2-V_H1-V_L2 : 28.25 mg/L
- 3 : 2H2-V_H1-V_L3 : 42.0 mg/L

【第9圖】

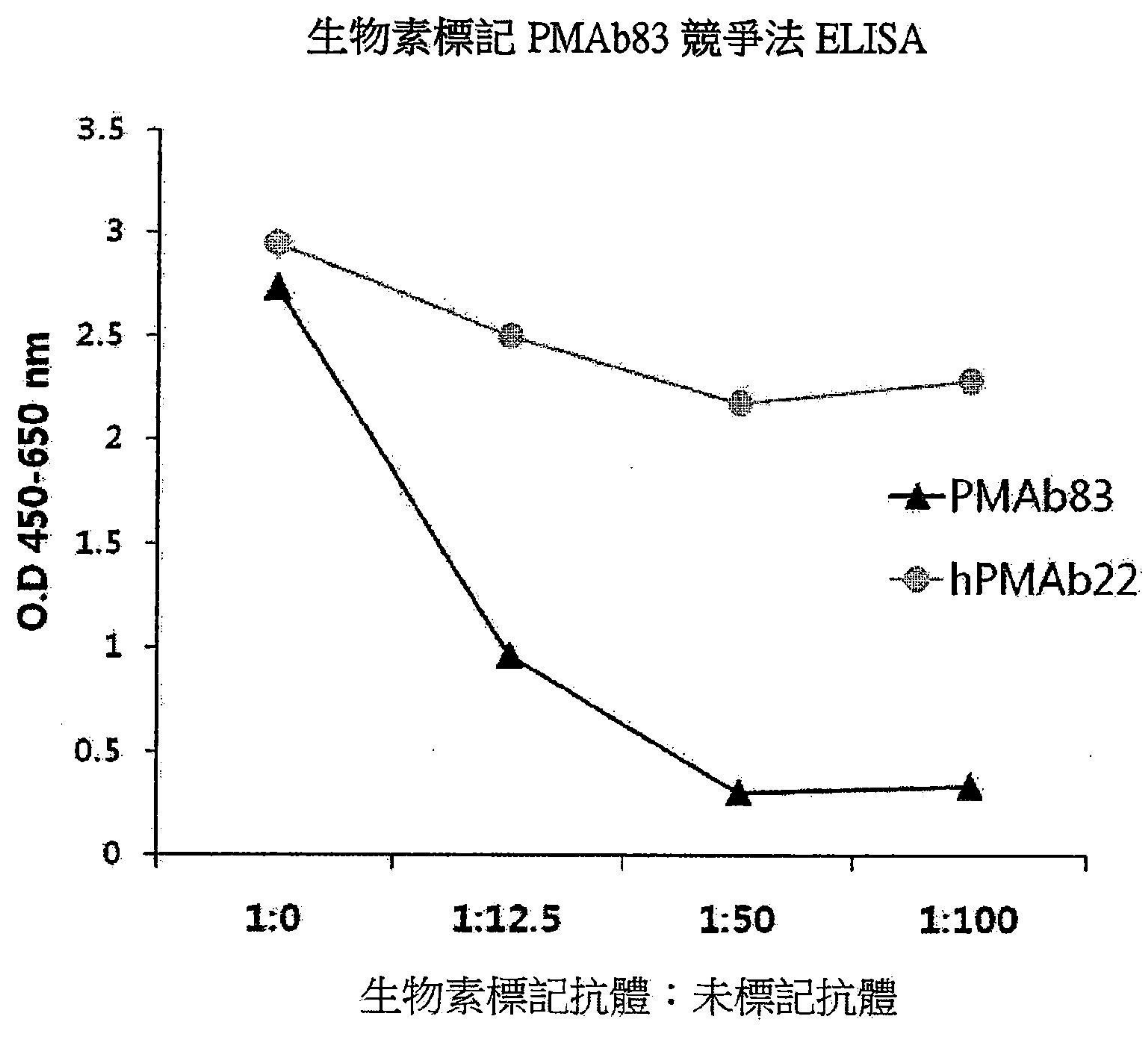


【第10圖】

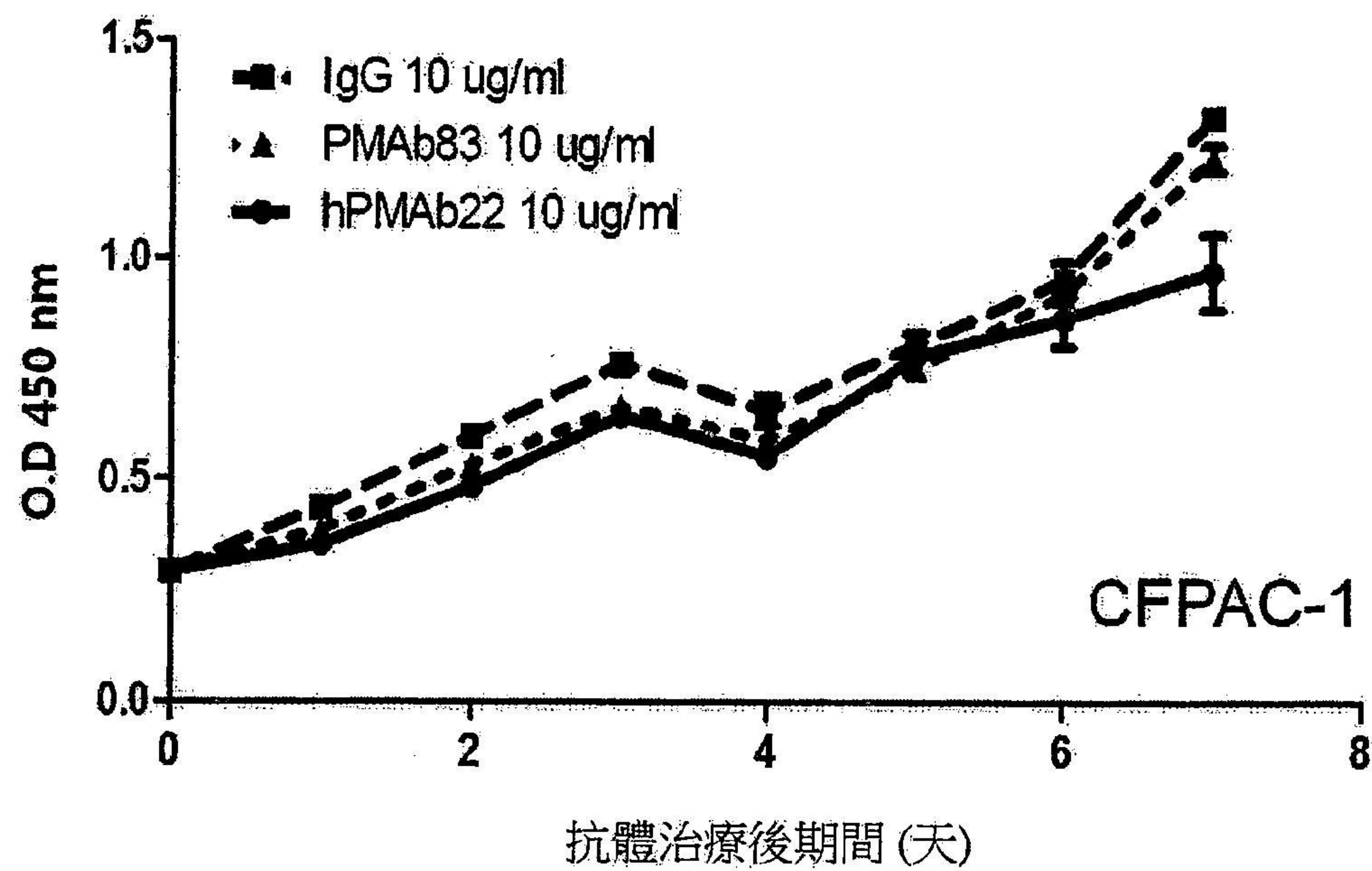


抗體	$K_d (10^{-9} M)$
PMAb83	1.169
hPMAb22	0.1938

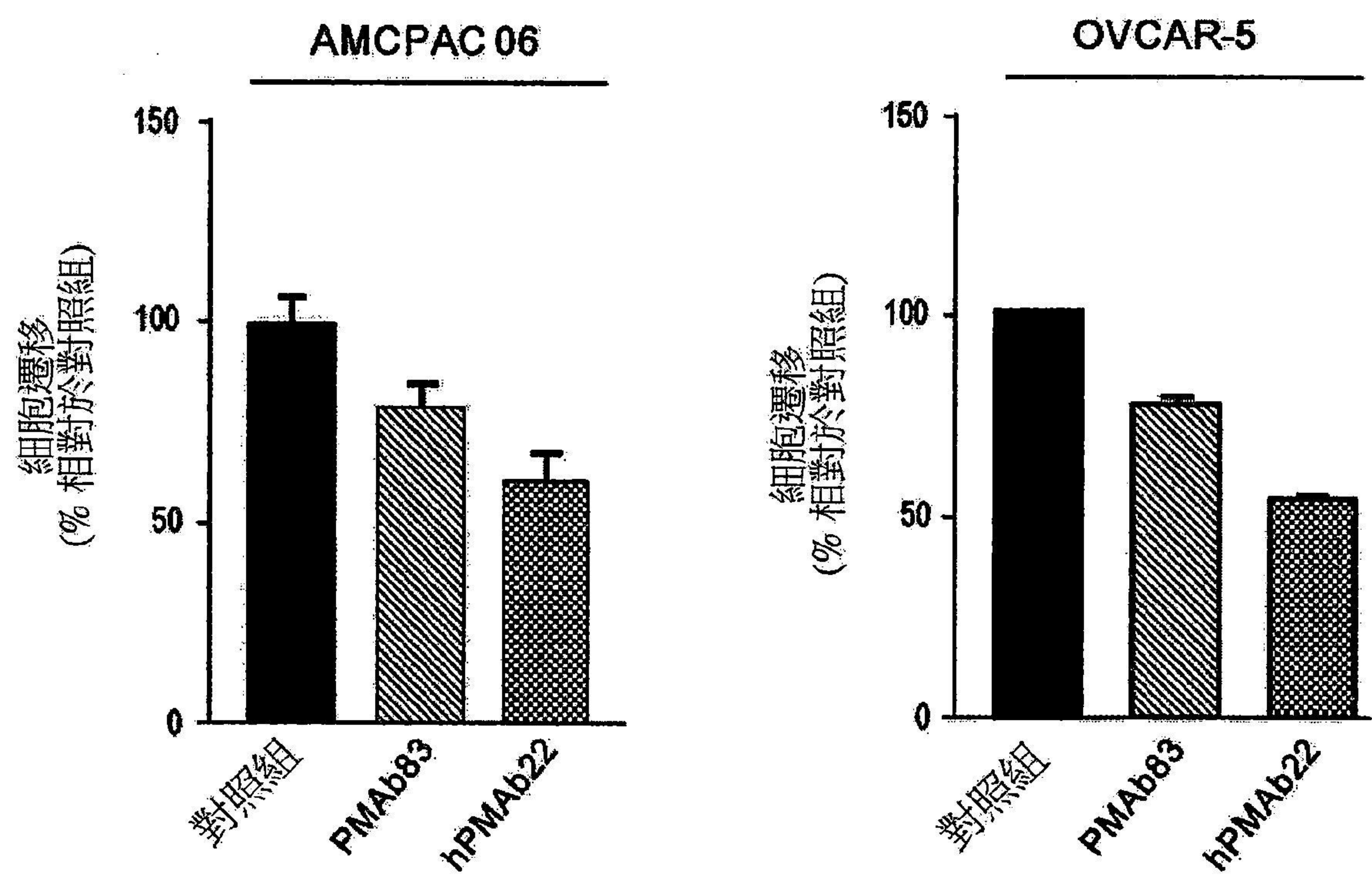
【第11圖】



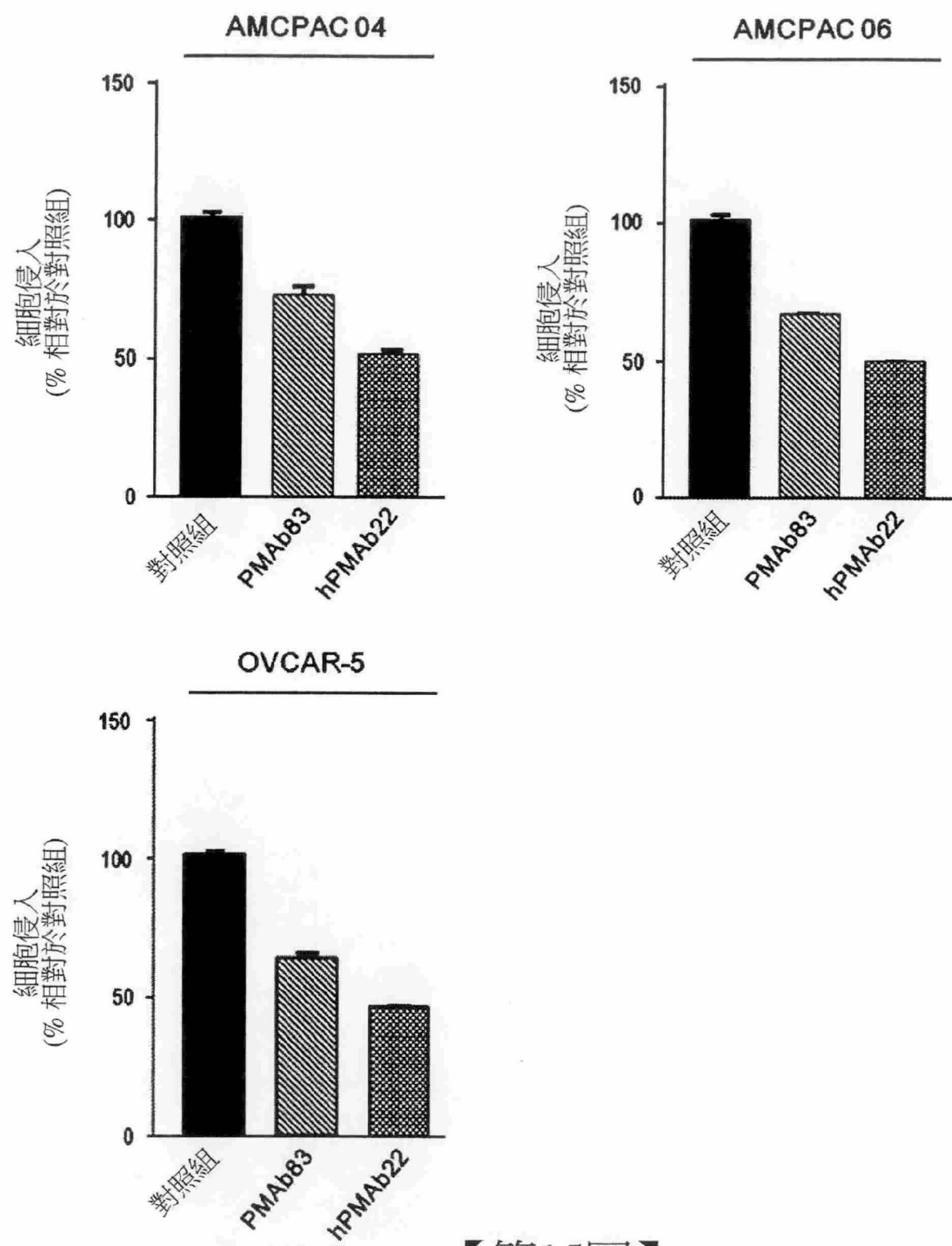
【第12圖】



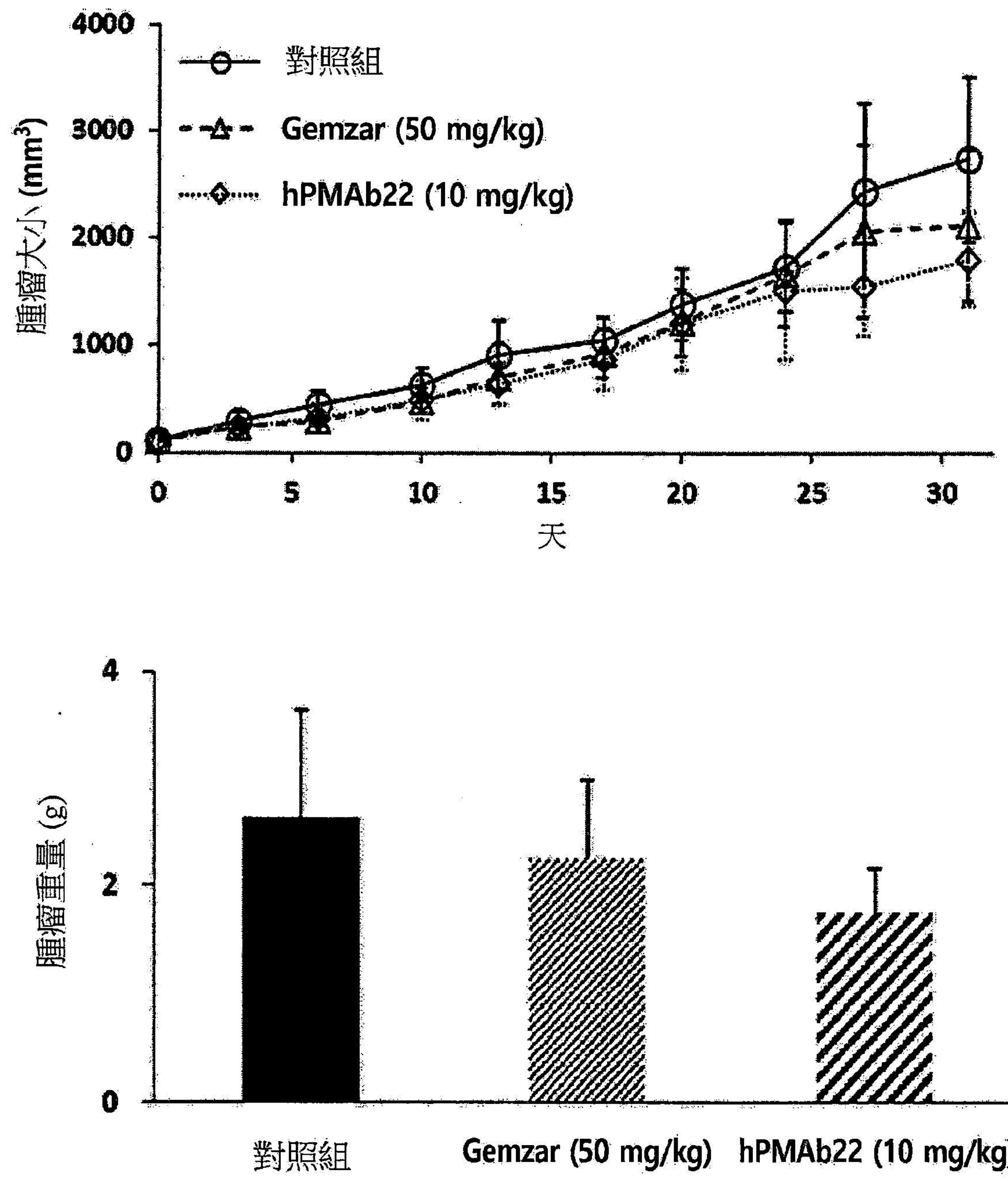
【第13圖】



【第14圖】



【第15圖】



【第16圖】