

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-503634

(P2012-503634A)

(43) 公表日 平成24年2月9日 (2012. 2. 9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 0 7 K 16/18 (2006. 01)</b>	C O 7 K 16/18 Z N A	4 C O 8 5
<b>G O 1 N 33/574 (2006. 01)</b>	G O 1 N 33/574 A	4 H O 4 5
<b>A 6 1 K 39/395 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 39/395 T	
<b>A 6 1 K 49/00 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 39/395 E	
<b>A 6 1 P 35/00 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 49/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-528349 (P2011-528349)	(71) 出願人	508362608
(86) (22) 出願日	平成21年9月25日 (2009. 9. 25)		プロテオシス アクチエンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成23年4月27日 (2011. 4. 27)		ProteoSys AG
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/062470		ドイツ連邦共和国 マインツ カールーツ
(87) 国際公開番号	W02010/034825		アイス-シュトラッセ 51
(87) 国際公開日	平成22年4月1日 (2010. 4. 1)		Carl-Zeiss-Strasse
(31) 優先権主張番号	61/100, 367		51, D-55129 Mainz,
(32) 優先日	平成20年9月26日 (2008. 9. 26)		Germany
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100099483
			弁理士 久野 琢也
		(74) 代理人	100061815
			弁理士 矢野 敏雄
		(74) 代理人	100112793
			弁理士 高橋 佳大

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 天然のアネキシン A 3 を認識する新規抗体

## (57) 【要約】

本発明は、天然のアネキシン A 3 を認識する新規抗体に関する。これらの抗体は、診断及び治療的用途に適している。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒトアネキシン A 3 のアミノ酸配列 59 ～ 67 :

E Y Q A A Y G K E ( 配列番号 1 )

中のエピトープに対応する天然のアネキシン A 3 を認識する抗体又は前記抗体の抗原結合フラグメント。

## 【請求項 2】

( i ) 抗体

- T G C 4 2

- T G C 4 3 又は

- T G C 4 9

( i i ) ( i ) からの抗体と同一の抗原結合部位を有する抗体及び

( i i i ) 前記抗体の抗原結合フラグメント

から選択される、請求項 1 に記載の抗体。

## 【請求項 3】

ヒトアネキシン A 3 のアミノ酸配列 1 ～ 106 中の立体構造エピトープに対応する天然のアネキシン A 3 を認識する抗体又は前記抗体の抗原結合フラグメント。

## 【請求項 4】

ヒトアネキシン A 3 のアミノ酸配列 1 ～ 34 中の立体構造エピトープに対応する請求項 3 に記載の抗体又は前記抗体の抗原結合フラグメント。

## 【請求項 5】

ヒトアネキシン A 3 のアミノ酸配列 35 ～ 106 の立体構造エピトープに対応する請求項 3 に記載の抗体又は前記抗体の抗原結合フラグメント。

## 【請求項 6】

( i ) 抗体

- T G C 4 4 又は

- T G C 4 8、

( i i ) ( i ) からの抗体と同一の抗原結合部位を有する抗体及び

( i i i ) 前記抗体の抗原結合フラグメント

から成る群から選択される、請求項 3、4 又は 5 に記載の抗体。

## 【請求項 7】

( i ) 抗体 T G C 4 2、T G C 4 3、T G C 4 4、T G C 4 5、T G C 4 6、T G C 4 7、T G C 4 8 又は T G C 4 9

( i i ) ( i ) からの抗体と同一の結合部位を有する抗体及び

( i i i ) ( i ) 又は ( i i ) からの抗体と天然のヒトアネキシン A 3 上で同一のエピトープを認識する抗体及び

( i v ) 前記抗体の抗原結合フラグメント

から選択される、天然のアネキシン A 3 を認識する抗体。

## 【請求項 8】

モノクローナル抗体、ダイマー抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体又は組み換え抗体又はこれらのフラグメントである、請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項に記載の抗体。

## 【請求項 9】

医薬、特にヒト医薬における使用のための、請求項 1 から 8 までのいずれか 1 項に記載の抗体。

## 【請求項 10】

診断又は治療的用途のための、請求項 9 に記載の抗体。

## 【請求項 11】

癌、特に前立腺癌の診断のための、請求項 9 又は 10 に記載の抗体。

## 【請求項 12】

天然の条件下で実施する診断アッセイにおける使用のための、請求項 9、10 又は 11

10

20

30

40

50

に記載の抗体。

【請求項 13】

E L I S A において使用するための、請求項 12 に記載の抗体。

【請求項 14】

試料を、天然のアネキシン A 3 の存在及び / 又は量に関して分析する、癌の診断方法。

【請求項 15】

天然のアネキシン A 3 を、請求項 1 から 8 までのいずれか 1 項に記載の抗体との反応によって検出する、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

試料が体液、特に尿又は圧搾尿である、請求項 14 又は 15 に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、天然のアネキシン A 3 を認識する新規抗体に関する。これらの抗体は、診断的及び治療的用途に適している。

【0002】

従来の研究において、ANXA3 は前立腺疾患及び前立腺癌の進行及び種々の段階と顕著に関係していることが示された。なおも、ヒト前立腺における ANXA3 の役割及び生態に関して知られているのはわずかである。これまで ANXA3 は、種々の上皮から放出される小胞である、いわゆるエキソソームの一部であるとされている。ANXA3 の診断的

20

【0003】

前立腺癌及び他の尿生殖路の上皮癌の治療又は診断のためのタンパク質バイオマーカーは、US 2005 130 876, 20、WO 03 086 461、WO 2005 078 124、EP 05 011 042.8及びEP 0 5 026 092.6に記載されている。これら文献の内容は、本願明細書中に引用により含まれる。

【0004】

US 60/812,089及びUS 60/859,489は、癌の診断を開示しており、その際、試料は、高い特異性を有するモノクローナル抗体を用いて、アネキシン A 3 の存在及び / 又は量に関して分析されている。これら文献の内容は、本願明細書中に引用により含まれる。

30

【0005】

ANXA3 は、前立腺癌のためのマーカーとして及び組織切片中の良性、前悪性及び悪性の状態における種々の診断に関する方法のための特異的抗体として利用可能であることが知られているが、これらの抗体による尿及び圧搾尿 (exprimete urine) 中の ANMX A 3 の測定は、極めて困難である。

【0006】

尿中の「天然の」ANXA3 の立体構造は、ウェスタンブロット又は組織染色において高い特異性を有する現在入手可能な抗体がタンパク質画分を検出するにとどまる。これは、おそらくは、タンパク質の特異的認識のために重要なエピトープとの接触を困難とする、エキソソーム / プロスタソーム中の ANXA3 のフォールディングによる。これらのエピトープは、先行する特許出願において調査され、かつ詳細に記載されている。

40

【0007】

本発明の目的は、体液、例えば尿及び圧搾尿中の天然の ANXA3 の存在割合を定量的に調べることである。

【0008】

本発明によれば、変性条件及びウェスタンブロット技術を使用することによってのみ予想的関連性 (prognostic relevance) が可能であった従来の抗 ANXA3 抗体を使用して、尿中の ANXA3 の効果的な検出が見出された。これらの従来の抗体のいずれもが、圧搾尿を「天然の」条件下で試験する E L I S A ベースの試験においては良好に働くもので

50

はなかった。

【 0 0 0 9 】

驚くべきことに、A N X A 3 の完全特異的「抗体 - 反応性表面」を構成し、かつ従来記載されたエピトープの隣に、尿、圧搾尿及び他の体液（例えば血漿又は血清）中の「天然」のA N X A 3 を認識する抗体が、天然のA N X A 3 を特異的に認識するための付加的なエピトープを有することを見出した。

【 0 0 1 0 】

第 1 の態様において、本発明は、天然のアネキシン A 3 、特に天然のヒトアネキシン A 3 を認識する抗体に関する。これらの抗体は、非変性条件下で、すなわち体液、例えば尿及び圧搾尿中で、A N X A 3 に特異的に結合することが可能である。

10

【 0 0 1 1 】

第 1 の好ましい実施態様において、本発明は、天然のアネキシン A 3 を認識する抗体又は前記抗体の抗原結合フラグメントに関し、この場合、この抗体は、ヒトアネキシン A 3 のアミノ酸配列 5 9 ~ 6 7 :

E Y Q A A Y G K E ( 配列番号 1 )

のエピトープに対応するものである。

【 0 0 1 2 】

このような抗体の特別な例は、以下のものから選択される :

( i ) 抗体

- T G C 4 2 、

- T G C 4 3 又は

- T G C 4 9

( i i ) ( i ) の抗体と同一の抗原結合部位を有する抗体及び

( i i i ) 前記抗体の抗原結合フラグメント。

20

【 0 0 1 3 】

他の好ましい実施態様は、ヒトアネキシン A 3 のアミノ酸配列 1 ~ 1 0 6 中の立体構造エピトープに対応する天然のアネキシン A 3 を認識する抗体又は前記抗体の抗原結合フラグメントに関する。

【 0 0 1 4 】

例えば、この抗体は、ヒトアネキシン A 3 のアミノ酸配列 1 ~ 3 4 中の立体構造エピトープに対応するものであってもよい、あるいは、前記抗体の抗原結合フラグメントであってもよい。代替的に、この抗体は、ヒトアネキシン A 3 のアミノ酸配列 3 5 ~ 1 0 6 中の立体構造エピトープに対応するものであってもよい、あるいは、前記抗体の抗原結合フラグメントであってもよい。

30

【 0 0 1 5 】

このような抗体の特別な例は、以下のものから選択される :

( i ) 抗体

- T G C 4 4 又は

- T G C 4 8 、

( i i ) ( i ) の抗体と同一の抗原結合部位を有する抗体及び

( i i i ) 前記抗体の抗原結合フラグメント。

40

【 0 0 1 6 】

さらに他の実施態様において、本発明の抗体は以下のものから選択される :

( i ) 抗体 T G C 4 2 、 T G C 4 3 、 T G C 4 4 、 T G C 4 5 、 T G C 4 6 、 T G C 4 7 、 T G C 4 8 又は T G C 4 9 、

( i i ) ( i ) の抗体と同一の抗原結合部位を有する抗体及び

( i i i ) ( i ) 又は ( i i ) の抗体と天然のヒトアネキシン A 3 上で同一のエピトープを認識する抗体及び

( i v ) 前記抗体の抗原結合フラグメント。

【 0 0 1 7 】

50

ハイブリドーマ細胞系生産抗体 T G C 4 2 ( D S M A C C 2 9 7 2 )、T G C 4 3 ( D S M A C C 2 9 7 0 )、T G C 4 4 ( D S M A C C 2 9 7 6 )、T G C 4 5 ( D S M A C C 2 9 7 4 )、T G C 4 6 ( D S M A C C 2 9 7 5 )、T G C 4 7 ( D S M A C C 2 9 7 7 )、T G C 4 8 ( D S M A C C 2 9 7 1 ) 及び T G C 4 9 ( D S M A C C 2 9 7 3 ) を、ブダペスト条約に基づき、D S M Z ( Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ) Inhoffenstr.7B, 38124 Braunschweigにおいて、2008年9月17日に寄託した。

【0018】

本発明の抗体はモノクローナル抗体、キメラ化抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体又は組み換え抗体、例えば単鎖抗体又はこのような抗体の抗原結合フラグメント、例えばタンパク質分解フラグメント又は組み換え単鎖抗体フラグメントであってもよい。この抗体は、医薬、特にヒト医薬において有用である。より詳細には、抗体は診断的又は治療的用途において使用することができる。より好ましくは、抗体は癌、例えば前立腺癌の診断のために使用される。有利には、本発明の抗体は、診断的アッセイにおける使用のためのものであり、この場合、このアッセイは天然の条件下で、例えば捕捉 (capture) アッセイ、例えば E L I S A 下で実施され、この際、天然のアネキシン A 3 の存在及び / 又は量を測定する。

10

【0019】

治療的及び診断的用途のために、本発明の抗体は、公知のエフェクター基又は標識基と結合していてもよい。エフェクター基は、細胞毒性基又は化合物、例えば化学療法剤又は放射性核種から選択することができる。標識基は、任意の公知標識基、例えばフルオレセンス基、ルミネセンス基、酵素標識、放射性標識等から選択されてもよい。抗体に対するエフェクター基又は標識基の結合は、公知の技術によって実施することができる。

20

【0020】

他の実施態様において、本発明は癌、好ましくは前立腺癌を診断するための方法に関し、この際、体液試料は、天然のアネキシン A 3 の存在及び / 又は量に関して分析される。

【0021】

好ましくは、本発明の診断的方法は、天然のアネキシン A 3、特に天然のヒトアネキシン A 3 の、前記の抗体との反応による検出を含む。試料は、好ましくは体液、例えば尿又は尿沈渣である。

30

【0022】

本発明によって診断することができる癌は、好ましくは尿生殖器及び / 又は胃腸管の癌、たとえば前立腺、膀胱、腎臓、尿道、卵巣、子宮又は結腸の癌であってもよい。特に、この癌は上皮癌である。特に好ましい実施態様において、癌は前立腺癌である。

【0023】

好ましい実施態様において、本発明は、疾病段階及び / 又は予後評価の種々の診断を含む。例えば、本発明は、以下のものから選択された疾病段階の種々の診断を可能にする：

( i ) 良性の状態、特に良性の前立腺の状態、例えば良性の前立腺増殖症 ( B P H )、繊維症及び慢性の前立腺炎、

( i i ) 前悪性の状態、例えば高いレベルの前立腺上皮内新生物 ( H G P I N ) を含む種々の段階 ( P I N - 1 - 3 ) の前立腺上皮内新生物、及び / 又は

( i i i ) 悪性状態、例えば前立腺癌、特にグリーソン分類によって示された進行状態における進行した前立腺癌。

40

【0024】

より好ましくは、本発明は、一方で良性又は前悪性状態と、他方で悪性状態との間の種々の診断を可能にする。

【0025】

本発明の好ましい実施態様において、天然の A N X A 3 の存在、量及び / 又は分布は、体液又は組織試料であってもよい試料中で測定する。存在、量及び細胞間の局在は、同一の組織試料又は同一対象からの種々の試料、例えば体液試料及び組織試料において測定さ

50

れてもよい。

【0026】

試料中の天然のANXA3の高い量、例えば、組織試料の強い染色に相当するものは、良性状態に関する第一の指標である。天然のANXA3の中程度の量/低い量は、前悪性状態又は初期/初期～中期の段階の悪性状態に関する指標である。試料中の天然のANXA3の不在は、悪性状態に関する指標であり、主に、例えば中期又は末期の段階の進行した段階における悪性状態に関する指標である。

【0027】

小胞、例えばエキソソーム及び/又はプロスタソーム中の天然のANXA3の存在は、良性又は前悪性の状態に関する主な指標である。これらの小胞は、種々の遠心分離によって尿又は体液中から得ることができるので、本発明は、前記体液の任意のフラクション中の天然のANXA3の検出に関する。

10

【0028】

さらに本発明の方法は、アネキシンA3に対する自己抗体の検出を含むものであってもよい。

【0029】

ANXA3に対する自己免疫応答の存在、例えばANXA3に対する自己抗体の存在は、悪性の状態、特に進行した状態における悪性の状態に関する主な指標である。

【0030】

本発明は、試料中のポリペプチドの測定を含む。好ましくは、この測定は、免疫学的方法を含み、その際、試料中の成分の存在、量及び/又は局在は、免疫学的試薬を用いて測定する。

20

【0031】

試料中の天然のANXA3を測定するための試薬は、好ましくは天然のANXA3に対して特異的な抗体、例えばポリクローナル抗体又は前記モノクローナル抗体である。

【0032】

試料中のANXA3自己抗体を測定するための試薬は、好ましくは認識のために重要な特異的エピトープを含むANXA3ポリペプチド又はこれらのフラグメントである。より好ましくは、ANXA3ポリペプチドは、天然の状態に再生された、組み換えANXA3ポリペプチドであるか、あるいは、ヒト又は他の哺乳類源から単離された天然ANXA3である。

30

【0033】

本発明の方法は、免疫学的測定のために適した任意の試験様式で実施することができ、これは自動化装置のために適した試験様式を含むものである。いくつかの試験様式において、標識基、たとえば視覚化標識、例えばラテックス又はゴールドビーズ、フルオレセンス標識基、酵素標識基等を含む試薬を使用することが好ましいものであってもよい。試薬及び標識基の結合体は、標準的方法、たとえば試薬の反応性アミノ酸側鎖、たとえばカルボキシ基、アミノ基及び/又はチオール基に対する標識基での、たとえば二官能性スペーサー分子を介しての共有結合によって製造することができる。

【0034】

試料は好ましくはヒト患者から得られる。いくつかの実施態様において、方法は非破壊的診断手段であり、その際、試料は例えば尿試料、特に尿試料、圧搾尿試料又は糞便試料であってもよい。好ましい場合には、試料は予備処理手段、例えばゲルろ過を実施することができる。他の実施態様において、方法は形態化学的手段であってもよく、その際、試料は組織試料、特に生検、例えばパンチ生検であってもよい。組織化学的手段において、細胞間又は細胞外ANXA3の選択的測定は、試料の範囲内におけるANXA3の局在化を測定することによって実施することができる。

40

【0035】

好ましい実施態様において、本発明は、天然のANXA3の半定量的又は定量的測定を含む。この半定量的又は定量的測定は、予め定められたカットオフ値をベースとする試験

50

結果の評価及び疾病段階の範囲内における評価の結果の相関を含むものであってもよい。カットオフ値は、健康な人及び／又は公知方法にしたがって予め定められた疾病段階を有するヒトからの試料中において、天然のANXA3を測定することによって定められてもよい。さらに、試料中の天然のANXA3の量は、さらに染色された組織試料の評価及び疾病段階を有する評価の結果の相関によって定めることができる。

#### 【0036】

試料については、例えば、エキソソーム中の天然のANXA3の別個の測定を可能にする、分別手段をおこなってもよい。例えば、試料は、細胞ペレット及び上清を得るために遠心分離することができ、その際、細胞間アネキシンA3を細胞ペレット中で測定し、かつ細胞外アネキシンA3を上清中で測定する。特別な好ましい実施態様において、方法は、細胞外ANXA3の選択的測定を含む。他の特に好ましい実施態様において、方法は、細胞間ANXA3の選択的測定を含む。

10

#### 【0037】

本発明の方法は、付加的に他の癌マーカー、例えば癌マーカーの測定を含むものであってもよい。他のマーカーの測定は、天然のANXA3が測定されるのと同じ試料中で、あるいは種々の試料中で、例えば血液、血清及び／又は血漿試料中で実施されてもよい。特に好ましくは、血液、血清又は血漿マーカーの測定であり、特に、カリクレインプロテアーゼファミリーの少なくとも1種、例えば前立腺特異的抗原(PSA)及び／又は上皮細胞マーカーの少なくとも1種、特に前立腺特異的膜抗原(PSMA)である。

20

#### 【0038】

本発明はスクリーニング手段であってもよく、その際、固体又は固体群は癌、特に前立腺癌に対して試験される。他方において、方法は、予後評価又は治療的追跡試験を含むものであってもよく、その際、すでに癌、特に前立腺癌又はその予備段階に関して陽性であると診断された個体については、予後評価及び／又は治療コントロールモニタリングを行う。

#### 【0039】

特に好ましい実施態様において、本発明は疾病進行の予後評価に関し、これは任意の診断的アセスメント、特に治療コントロールのために重要なツールである。予後評価は、天然のANXA3単独で、あるいは、他のマーカー、例えばPSA、PCA3(Loeb S. Does PCA3 Help Identify Clinically Significant Prostate Cancer? Eur Urol. 2008 Jul 16.)、PCADM-1(Ohkia A, Hu Y, Wang M, Garcia FU, Steams ME. Clin Cancer Res. 2004 Apr 1; 10(7):2452-8. Links Evidence for prostate cancer-associated diagnostic marker-1: immunohistochemistry and in situ hybridization studies.)、EPCA-2(Katz MD, Kibel AS. Words of wisdom. Re:EPCA-2: a highly specific serum marker for prostate cancer. Eur Urol. 2008 Jan; 53(1):210), (Diamandis EP. POINT: EPCA-2: a promising new serum biomarker for prostatic carcinoma? Clin Biochem. 2007 Dec; 40(18): 1437-9. Epub 2007 Sep 19.), (Leman ES, Cannon GW, Trock BJ, Sokoll LJ, Chan DW, Mangold L, Partin AW, Getzenberg RH. EPCA-2: a highly specific serum marker for prostate cancer. Urology. 2007 Apr; 69(4):714-20)と組合せての測定をベースとするものであってもよく、この場合、これは前立腺癌に対して陽性に相関する。例えば、組織化学的評価及び／又はPSA又は他の癌マーカーのレベルの測定によって、患者は低いリスク群(例えばPSAレベル  $10 \text{ ng/ml}$ )、中程度のリスク群(例えばPSAレベル  $> 10$  及び  $< 20 \text{ ng/ml}$ )及び高いリスク群(例えばPSAレベル  $20 \text{ ng/ml}$ )に分類することができる。これら患者におけるANXA3の測定は、他の重要な情報、特に中程度のリスク群において分類されうる患者における重要な情報を導くことができる。これらの中程度のリスク患者がANXA3陽性である場合には、PSA不含の生存率の%は、ANXA3に関して陰性であると測定された患者における生存率に比べて極めて高い。したがって本発明は、個々の患者群に対するさらなるリスクの層化を可能にする。好ましくは、中程度のリスクに本来分類されている群の患者は、ANXA3測定の結果をベースとして再分類することができる。ANXA3陽性の患者は、低い

30

40

50

リスク群として再度分類されてもよく、かつ A N X A 3 陰性の患者（及び場合によっては A N X A 3 に対する自動免疫応答を有するもの）は、高いリスク群に分類される。

【 0 0 4 0 】

さらに、本発明はより詳細には以下の図面及び実施例によって説明することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 1 】

【図 1】アネキシン 3 の組み換えフラグメントを用いてウェスタンブロット中で試験されたモノクローナル抗体の反応性を実証する、ウェスタンブロット分析を示す図

【図 2】T G C 4 2 を用いてのペプチドシートの現像写真図

【図 3】ポリクローナル血清 P e t r o s の線状エピトープとの比較におけるアネキシン 3 特異的抗体のエピトープを示す図

【図 4 A】変性 A N X A 3 を認識する抗体及び天然の A N X A 3 を認識する抗体によって認識されたエピトープを含む、A N X A 3 空間構造を示す図

【図 4 B】変性 A N X A 3 を認識する抗体及び天然の A N X A 3 を認識する抗体によって認識されたエピトープを含む、A N X A 3 空間構造を示す図

【 0 0 4 2 】

実施例

マウスを、組み換えヒトアネキシン A 3 を用いて免疫化した。それによって、モノクローナル抗体が製造され、この抗体は、ポリクローナル抗血清 P e t r o s (Wozny W, Schroer K, Schwall GP, Poznanovic S, Stegmann W, Dietz K, Rogatsch H, Schaefer G, Huebl H, Klocker H, Schrattenholz A, Cahill MA. Differential radioactive quantification of protein abundance ratios between benign and malignant prostate tissues : cancer association of annexin A3. Proteomics. 2007 Jan; 7(2):313-22) との組合せにおいて、捕捉 E L I S A 中で、天然のアネキシン A 3 を認識することが可能である。

【 0 0 4 3 】

得られる抗体は、以下のようにしてデザインされる：

T G C 4 3 = D S M    A C C 2 9 7 0

T G C 4 8 = D S M    A C C 2 9 7 1

T G C 4 2 = D S M    A C C 2 9 7 2

T G C 4 9 = D S M    A C C 2 9 7 3

T G C 4 5 = D S M    A C C 2 9 7 4

T G C 4 6 = D S M    A C C 2 9 7 5

T G C 4 4 = D S M    A C C 2 9 7 6

T G C 4 7 = D S M    A C C 2 9 7 7

【 0 0 4 4 】

1 . ウェスタンブロット中の結合部位の局在化

第 1 の試験群において、ハイブリドーマ細胞 1 6 C 1 2 ( T G C 4 2 )、1 4 B 1 0 ( T G C 4 9 )、1 5 D 6 ( T G C 4 6 )、1 8 E 9 ( T G C 4 3 )、1 7 D 9 ( T G C 4 8 )、1 7 F 1 2 ( T G C 4 4 )、1 3 H 5 ( T G C 4 7 ) 及び 1 6 A 7 ( T G C 4 5 ) の細胞培養上清を、組み換えアネキシン 3 フラグメント v A N A 1、v A N A 4、v A N A 5、v A N A 7 及び v A N A 8 を用いてウェスタンブロット中で試験した。アネキシン 3 のこれらのフラグメントは、オーバーラッピングフラグメント中で、完全なアネキシン 3 を示す（図 1 参照）。すべての抗体上清は、フラグメント v A N A 1 を認識し、かつそれによって、完全長のアネキシン A 3 タンパク質を認識する。さらにすべての試験した抗体は、アネキシン 3 の N - 末端領域を示すフラグメント v A N A 7 を検出する（図 1 参照）。試験した抗体の結合部位は、アネキシン 3 の N - 末端 1 0 6 a a の範囲内である。

【 0 0 4 5 】

モノクローナル抗体中の結合部位をさらに局在化する目的のために、ウェスタンブロット中の第 2 の試験群における細胞培養上清を、アネキシン 3 のフラグメント v A N A 2 及び v A N A 3 に対するその反応性について試験した。v A N A 3 は、N - 末端領域 3 4 a



aを除いてフラグメントvANA2に相当する。モノクローナル抗体の2種(17D9(TGC48)及び17F12(TGC44))は、フラグメントvANA2のみを認識し、残りの抗体は、双方のアネキシン3フラグメントを認識する。これらの試験は、製造された抗体において少なくとも2個の異なる反応性が存在することを示す。モノクローナル抗体17D9(TGC48)及び17F12(TGC44)中では、反応性は、N-末端34aaに関連するがその一方で、残りの抗体の結合部位は、アネキシン3配列のアミノ酸35と106との間である。

#### 【0046】

2. ペプチドスキャンを用いての選択された抗体のエピトープマッピング

モノクローナル抗体16C12(TGC42)、18E9(TGC43)、17F12(TGC44)、14B10(TGC49)、17D9(TGC48)並びに種々の抗体上清のエピトープを、ペプチドスキャンによって測定した。

#### 【0047】

2. 1 抗体16C12(TGC42)、18E9(TGC43)及び14B10(TGC49)のエピトープマッピング

モノクローナル抗体16C12(TGC42)、18E9(TGC43)及び14B10(TGC49)の細胞培養上清を、そのエピトープを特徴付けるために希釈されていない形で使用した。これらの3種の抗体は、ペプチドスキャン中で別個の結果を示す。ペプチドシート現像写真の典型的な結果は、図2に示す。モノクローナル抗体16C12(TGC42)、18E9(TGC43)及び14B10(TGC49)は、ペプチドシートのペプチドスポット18~20を認識する。

#### 【0048】

ペプチドシート現像写真の分析

#### 【表1】

17	NAQRQLIVKEYQAAY	-
18	RQLIVKEYQAAYGKE	++
19	IVKEYQAAYGKELKD	+++
20	EYQAAYGKELKDDLK	++
21	AAYGKELKDDLKGD	-

30

#### 【0049】

モノクローナル抗体16C12(TGC42)、18E9(TGC42)及び14B10(TGC49)のエピトープは、アミノ酸配列EYQAAYGKE(アネキシンA3の位置59~67)の範囲内である。

#### 【0050】

2. 2 抗体17D9(TGC48)及び17F12(TGC44)のエピトープマッピング

モノクローナル抗体17D9(TGC48)及び17F12(TGC44)の細胞培養上清は、そのエピトープの特徴付けのために希釈されていない形で使用した。双方の抗体上清は、ペプチドスキャン中のスポットを示すものではなかった。明らかに、双方の抗体は、アネキシンA3の線状のエピトープではなく、立体構造エピトープを認識するものである。

40

#### 【0051】

これらの結果に基づいて、抗体17D9(TGC48)及び/又は17F12(TGC44)によって認識された立体構造エピトープは、ヒトアネキシンA3のアミノ酸1~106、1~34及び/又は35~106の範囲内で局在化していてもよい。図3は、ポリクローナル抗血清Petrosの線状エピトープとの比較におけるANXA3特異的抗体によって認識されたエピトープを示す。図は、ポリクローナル血清Petrosのペプチドスキャンを示す。種々のモノクローナル

50

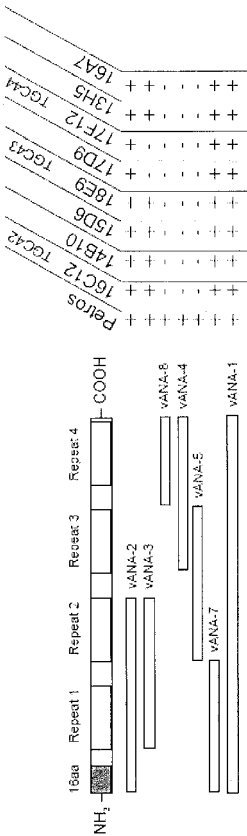
抗体のエピトープが示される。

【 0 0 5 2 】

図 4 は、変性 A N X A 3 を認識する抗体及び天然の A N X A 3 を認識する抗体によって認識されたエピトープを含む、A N X A 3 空間構造を表す。

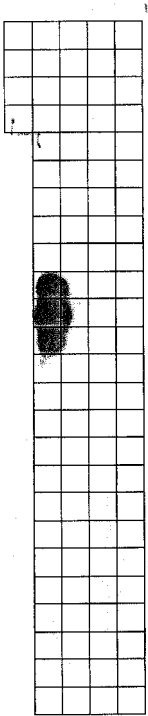
【 図 1 】

ウエスタンブロット分析：ウエスタンブロットにおいて、アネキシン 3 の組み換えフラグメントを用いて試験されたモノクローナル抗体の反応性を証明するもの



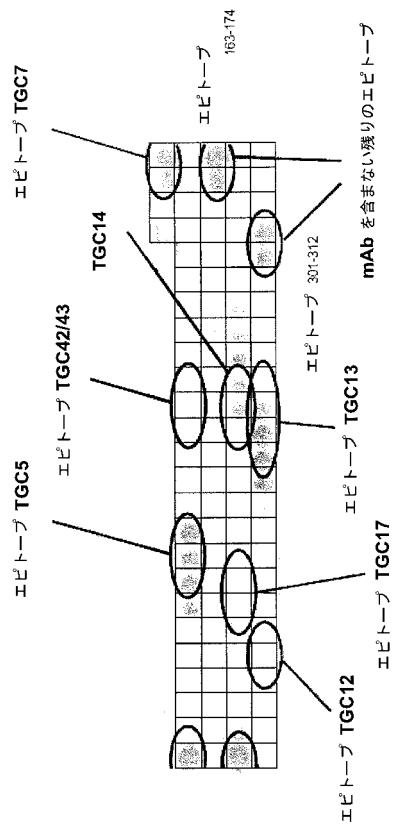
【 図 2 】

TGC42を用いてのペプチドシートの現像写真  
モノクローナル抗体 TGC42 の細胞培養上清を用いてのペプチドシートの現像写真



【図 3】

ポリクローナル血清 *Petros* の線状エピトープとの比較におけるアナキシン3抗体のエピトープ  
ポリクローナル血清のペプチドスキャンを示す。種々のモノクローナル抗体のエピトープを色で標識する。



【図 4 A】

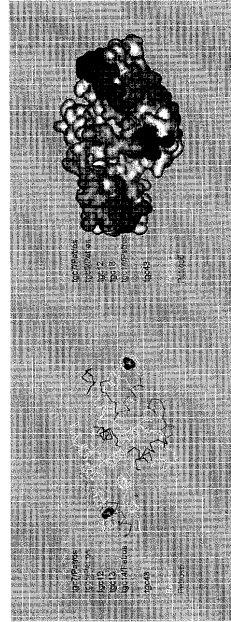


Figure 4A

【図 4 B】

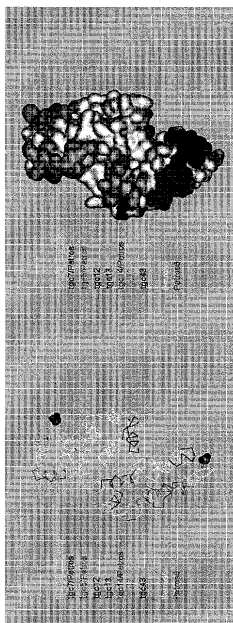


Figure 4B

【配列表】

2012503634000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2009/062470

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/30 G01N33/574 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/141043 A2 (PROTEOSYS AG [DE]; SCHRATTENHOLZ ANDRE [DE]) 13 December 2007 (2007-12-13) the whole document	1-16
A	KOLLERMANN J ET AL: "Expression and Prognostic Relevance of Annexin A3 in Prostate Cancer" EUROPEAN UROLOGY, ELSEVIER BV, NL, vol. 54, no. 6, 16 January 2008 (2008-01-16), pages 1314-1323, XP025685829 ISSN: 0302-2838 [retrieved on 2008-01-16] the whole document	1-16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 document 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		Date of mailing of the international search report
29 April 2010		07/05/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Ulbrecht, Matthias

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2009/062470

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- ☒ on paper
- ☒ in electronic form
- b. (time)
- ☐ in the international application as filed
- ☐ together with the international application in electronic form
- ☒ subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2009/062470**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

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

International Application No. PCT/EP2009/062470

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 2(completely); 7-16(partially)

An antibody recognising native annexin A3 (ANXA3) directed against an epitope in the amino acid sequence 59-67 of human ANXA3 or an antigen binding fragment thereof; an antibody as defined in claim 7 but limited to TGC42, TGC43 and TGC49; an antibody as defined in claims 9-13 but limited to the said antibodies; a method for the diagnosis of cancer as defined in claim 14 wherein the said antibodies are used to detect native ANXA3.

---

2. claims: 3-6(completely); 7-16(partially)

An antibody recognising native ANXA3 directed against a conformational epitope in the amino acid sequence 1-106 of human ANXA3 or an antigen binding fragment thereof; an antibody as defined in claim 7 but limited to TGC44 and TGC48; an antibody as defined in claims 9-13 but limited to the said antibodies; a method for the diagnosis of cancer as defined in claim 14 wherein the said antibodies are used to detect native ANXA3.

---

3. claims: 7-16(partially)

An antibody as defined in claim 7 but limited to TGC45; an antibody as defined in claims 9-13 but limited to the said antibodies; a method for diagnosis of cancer as defined in claim 14 wherein the said antibody is used to detect native ANXA3.

---

4-5. claims: 7-16(partially)

Idem as invention 3, but each of inventions 4 and 5 limited to TGC46 and TGC47, respectively.

---



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/062470

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007141043 A2	13-12-2007	AU 2007256377 A1	13-12-2007
		CA 2654330 A1	13-12-2007
		DE 07725949 T1	02-07-2009
		EP 2024748 A2	18-02-2009
		JP 2009540278 T	19-11-2009
		KR 20090023372 A	04-03-2009

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

A 6 1 P 35/00

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

(74)代理人 100128679

弁理士 星 公弘

(74)代理人 100135633

弁理士 二宮 浩康

(74)代理人 100156812

弁理士 篠 良一

(74)代理人 100114890

弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラインハルト

(72)発明者 スロボダン ポツナノヴィチ

ドイツ連邦共和国 マインツ タウヌスシュトラッセ 1 3

(72)発明者 ゲアハート シュヴァル

ドイツ連邦共和国 マインツ エイブラハム - リンカーン - シュトラッセ 2

F ターム(参考) 4C085 AA13 AA14 AA16 BB36 CC03 CC22 CC23 EE01 EE03 KA04

KA05 LL18

4H045 AA11 DA75 EA20 EA50