



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/30 (2020.05); A61K 39/00 (2020.05); A61P 35/00 (2020.05); G01N 33/5023 (2020.05)

(21)(22) Заявка: 2019113308, 16.08.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.08.2017

Дата регистрации:
28.10.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
28.07.2017 KR 10-2017-0096370

(45) Опубликовано: 28.10.2020 Бюл. № 31

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 26.06.2019

(86) Заявка РСТ:
KR 2017/008893 (16.08.2017)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2019/022281 (31.01.2019)

Адрес для переписки:
191036, Санкт-Петербург, а/я 24,
"НЕВИНПАТ"

(72) Автор(ы):

КО Сан Сок (KR),
КИМ Ён Чон (KR),
ЮН Со Ын (KR),
КИМ Сон Чоль (KR),
ХОН Сын-Мо (KR),
ЧОН Сон Юн (KR)

(73) Патентообладатель(и):

ДОН-А ЮНИВЕРСИТИ РИСЕРЧ
ФАУНДЕШН ФОР
ИНДАСТРИ-АКАДЕМИ КООПЕРЕЙШН
(KR),
ПРЕСТИЖ БИОФАРМА ПТИ. ЛТД. (SG)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2007145466 A1, 21.12.2007. KIM,
Yun-Hee et al. Efficient Targeting and Tumor
Retardation Effect of Pancreatic Adenocarcinoma
Up-regulated Factor (PAUF)-specific RNA
Replacement in Pancreatic Cancer Mouse Model,
Cancer Letters, 2014. v. 344, pp. 223-231. RU
2015110690 A, 20.10.2016.

(54) Антитело, специфично связывающееся с белком PAUF, и его применение

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к антителу, которое связывается с белком активирующего фактора аденокарциномы поджелудочной железы (PAUF). Также раскрыты полинуклеотид, кодирующий указанное антитело; экспрессионный вектор и трансформант, содержащие указанный полинуклеотид; фармацевтическая композиция, конъюгат, набор, содержащие указанное антитело. Раскрыты

способы предупреждения или лечения рака, ингибирования пролиферации, миграции или инвазии раковых клеток, диагностики рака и скрининга с помощью указанного антитела. Изобретение обладает способностью эффективно лечить раковые заболевания, где рак представляет собой рак поджелудочной железы или рак яичников. 12 н. и 2 з.п. ф-лы, 16 ил., 3 табл., 3 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 16/30 (2020.05); A61K 39/00 (2020.05); A61P 35/00 (2020.05); G01N 33/5023 (2020.05)(21)(22) Application: **2019113308, 16.08.2017**(24) Effective date for property rights:
16.08.2017Registration date:
28.10.2020

Priority:

(30) Convention priority:
28.07.2017 KR 10-2017-0096370(45) Date of publication: **28.10.2020 Bull. № 31**(85) Commencement of national phase: **26.06.2019**(86) PCT application:
KR 2017/008893 (16.08.2017)(87) PCT publication:
WO 2019/022281 (31.01.2019)Mail address:
191036, Sankt-Peterburg, a/ya 24, "NEVINPAT"

(72) Inventor(s):

**KOH Sang Seok (KR),
KIM Yeon Jeong (KR),
YOUN So Eun (KR),
KIM Song Cheol (KR),
HONG Seung-Mo (KR),
JEONG Seong Yun (KR)**

(73) Proprietor(s):

**DONG-A UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION FOR INDUSTRY-ACADEMY
COOPERATION (KR),
PRESTIGE BIOPHARMA PTE. LTD. (SG)**(54) **ANTIBODY SPECIFICALLY BINDING TO PAUF PROTEIN, AND ITS USE**

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to an antibody which binds to an activating factor protein of pancreatic adenocarcinoma (PAUF). Also disclosed is a polynucleotide encoding said antibody; an expression vector and a transformant containing said polynucleotide; pharmaceutical composition, conjugate, kit containing said antibody. What is disclosed are

methods for preventing or treating cancer, inhibiting proliferation, migration or invasion of cancer cells, diagnosing cancer and screening with said antibody.

EFFECT: invention is capable to effectively treat cancer diseases, where cancer is pancreatic cancer or ovarian cancer.

14 cl, 16 dwg, 3 tbl, 3 ex

Область техники

Настоящее изобретение относится к антителу, которое специфично связывается с белком активирующего фактора аденокарциномы поджелудочной железы (PAUF) и к его применению.

5 Предшествующий уровень техники

Противораковые препараты, клинически применяемые в настоящее время, можно классифицировать как химиотерапевтические агенты и биотерапевтические агенты. Химиотерапевтические агенты, которые активно разрабатывались ранее, представляют собой лекарственные средства, проявляющие токсичность в отношении раковых клеток. Однако проблемы этих лекарственных средств заключаются в том, что они являются токсичными не только для раковых, но и для нормальных клеток, в то же время клетки могут быть толерантны к ним. Таким образом, существуют ограничения в разработке и применении этих лекарственных средств. В связи с этим в последние годы в качестве альтернативы активно разрабатываются биотерапевтические средства, которые могут восстанавливать или повышать иммунную функцию организма человека и тем самым снижать активность раковых клеток. Примеры биотерапевтических агентов, которые в настоящее время используют или разрабатывают, включают цитокины, рекомбинантные антитела (например моноклональные антитела), лекарственные средства на основе молекул нуклеиновых кислот, ингибиторы ангиогенеза и т.д.

Среди этих биотерапевтических агентов моноклональные антитела, предназначенные для лечения, характеризуются наличием низкого уровня побочных эффектов благодаря их высокой реакционной специфичности к мишеням. Антитела демонстрируют терапевтические эффекты посредством различных механизмов; например, они могут специфично связываться с соответствующими антигенами, чтобы ингибировать трансдукцию сигнала или индуцировать апоптоз посредством перекрестного сшивания, и, кроме того, могут демонстрировать терапевтические эффекты, активируя иммунную систему *in vivo*. Соответственно, моноклональные антитела в качестве противоракового агента могут специфически отслеживать раковые клетки и ингибировать их активность, а также индуцировать иммунные ответы и, таким образом, эффективно удалять раковые клетки. В результате лечение с использованием моноклональных антител становится основным лечением рака. В связи с этим, моноклональные антитела, такие как рамуцирумаб, ритуксимаб, трастузумаб и др., были разработаны и использовались для лечения рака желудка, рака молочной железы, рака печени и т.д.

При этом, белки активирующего фактора аденокарциномы поджелудочной железы (PAUF), которые сверхэкспрессируются в раковых клетках, таких как клетки рака поджелудочной железы, рака яичников, рака толстой кишки, рака шейки матки и т.д. и, которые вовлечены в развитие и метастазирование опухолей, как известно, активируют и стабилизируют β -катенин посредством нового паттерна фосфорилирования, тем самым способствуя быстрой пролиферации раковых клеток поджелудочной железы (Experimental & Molecular Medicine, 2011, 43, 82-90). Кроме того, поскольку сообщалось, что малые интерферирующие РНК, нацеленные на белки PAUF, могут снижать миграцию, инвазию и онкогенную способность клеток рака поджелудочной железы, растет интерес к белкам PAUF в качестве мишеней для диагностики, лечения и т.д. рака (Cancer Sci., 2009 May, 100(5): 828-836; Biochem Biophys Res Commun. 2014 Nov, 454(1): 144-150). В связи с этим ранее была разработана композиция для диагностики и лечения рака поджелудочной железы, содержащая человеческое антитело к белку PAUF (патент KR номер 10-1098186). Однако все еще существует потребность в разработке антител, оказывающих существенное влияние на диагностику и лечение различных видов рака,

с одновременным улучшением связывающей способности и аффинность к белкам PAUF.

Техническая задача

Авторы настоящего изобретения приложили усилия для разработки антитела, которое может специфично связываться с белком PAUF и демонстрировать превосходный эффект в лечении и диагностике различных видов рака. В результате они разработали химерные и гуманизированные антитела на основе мышинных анти-PAUF антител и подтвердили, что эти антитела обладают более высокой аффинностью и специфичностью к белкам PAUF и более высокой противораковой активностью в отношении рака поджелудочной железы, рака яичника и т.д. по сравнению с существующими человеческими анти-PAUF антителами, тем самым завершая настоящее изобретение

Техническое решение

Задачей настоящего изобретения является предложение антитела, которое связывается с белком активирующего фактора аденокарциномы поджелудочной железы (PAUF).

Другой задачей настоящего изобретения является предложение полинуклеотида, кодирующего это антитело.

Еще одной задачей настоящего изобретения является предложение экспрессионного вектора, содержащего полинуклеотид.

Еще одной задачей настоящего изобретения является предложение трансформанта, в который введен экспрессионный вектор.

Еще одной задачей настоящего изобретения является предложение фармацевтической композиции для предупреждения или лечения рака, содержащей данное антитело.

Еще одной задачей настоящего изобретения является предложение способа предупреждения или лечения рака, который включает введение данного антитела субъекту.

Еще одной задачей настоящего изобретения является предложение способа ингибирования пролиферации, миграции или инвазии раковых клеток, который включает введение данного антитела субъекту.

Еще одной задачей настоящего изобретения является предложение конъюгата антитело-лекарственное средство, в котором лекарственное средство конъюгировано с данным антителом.

Еще одной задачей настоящего изобретения является предложение композиции для диагностики рака, содержащей данное антитело.

Еще одной задачей настоящего изобретения является предложение набора для диагностики рака, содержащего данную композицию.

Еще одной задачей настоящего изобретения является предложение способа диагностики рака, который включает обнаружение белка PAUF в биологическом образце, выделенном из субъекта, с подозрением на рак, посредством реакции антиген-антитело с использованием антитела.

Еще одной задачей настоящего изобретения является предложение способа скрининга веществ для предупреждения или лечения рака, который включает: (а) обработку раковых клеток веществом-кандидатом для предупреждения или лечения рака; (б) измерение уровня белков PAUF в раковых клетках, обработанных этим веществом-кандидатом, с использованием антитела; и (в) определение, можно ли использовать вещество-кандидат, которое использовали на стадии (а), для предупреждения и лечения рака, когда уровень белка PAUF на стадии (б) ниже, чем у раковых клеток, не обработанных веществом-кандидатом.

Полезные эффекты изобретения

Настоящее изобретение относится к антителу, специфично связывающемуся с белком

активирующего фактора аденокарциномы поджелудочной железы (PAUF) и к его применению.

Антитело по настоящему изобретению связывается с белком PAUF с высокой специфичностью и аффинностью и тем самым ингибирует пролиферацию, миграцию, инвазию и рост *in vivo*, и, таким образом, антитело по настоящему изобретению можно эффективно использовать в области диагностики и лечения таких заболеваний, как рак, при которых сверхэкспрессируется белок PAUF.

Краткое описание графических материалов

На Фиг. 1 показаны графики, иллюстрирующие аффинность (А) и специфичность (В) 2Н2 и 20С5, которые представляют собой мышиные антитела против белка PAUF, в отношении белков PAUF.

На Фиг. 2 показан график, иллюстрирующий, что каждый из 2Н2 и 20С5 имеет эпитоп, отличный от РМАb83 (то есть существующего человеческого антитела против белка PAUF) и эта диаграмма показывает результаты конкурентной ELISA с меченым биотином 2Н2.

На Фиг. 3 показаны диаграммы, иллюстрирующие специфичность каждого из сРМАb22 и сРМАb205, представляющих собой химерные антитела против белка PAUF, к белкам PAUF. РМАb83 (то есть человеческое антитело) использовали в качестве сравнительной группы.

На Фиг. 4 показан график, иллюстрирующий аффинность каждого из сРМАb22 и сРМАb205 к белкам PAUF на основании результатов анализа ELISA. РМАb83 (то есть человеческое антитело) использовали в качестве сравнительной группы.

На Фиг. 5 показан график, иллюстрирующий ингибирующее действие сРМАb22 на пролиферацию раковых клеток на основании результатов анализа пролиферации WST-1. В частности, было подтверждено ингибирующее действие сРМАb22 на пролиферацию ВхРС-3 (то есть клеточную линию рака поджелудочной железы). IgG использовали в качестве контрольной группы, а РМАb83 использовали в качестве сравнительной группы.

На Фиг. 6 показана диаграмма, иллюстрирующая ингибирующее действие сРМАb22 на миграцию раковых клеток на основании результатов анализа миграции. В частности, были подтверждены ингибирующее действие сРМАb22 на CFPAC-1 (то есть на линию клеток рака поджелудочной железы) и АМСРАС04 (то есть на клетки рака поджелудочной железы, полученные от пациента с раком поджелудочной железы). РМАb83 использовали в качестве сравнительной группы.

На Фиг. 7 показаны графики, иллюстрирующие ингибирующее действие сРМАb22 на инвазию раковых клеток на основании анализа инвазии. В частности, были подтверждены ингибирующие эффекты сРМАb22 на CFPAC-1 (то есть на линию клеток рака поджелудочной железы) и АМСРАС04 (то есть на клетки рака поджелудочной железы, полученные от пациента с раком поджелудочной железы). РМАb83 использовали в качестве сравнительной группы.

На Фиг. 8 показан график, иллюстрирующий аффинность 2Н2-V_H1-V_L1, 2Н2-V_H1-V_L2 и 2Н2-V_H1-V_L3, представляющих собой гуманизированные антитела против белка PAUF, полученные в соответствии с одним воплощением настоящего изобретения, к белкам PAUF на основании результатов анализа ELISA. РМАb83, который представляет собой человеческое антитело, использовали в качестве сравнительной группы. сРМАb22 (то есть химерное антитело) и РМАb83 (то есть человеческое антитело) использовали в качестве сравнительных групп.

На Фиг. 9 показаны изображения, иллюстрирующие выход продукции 2Н2-VH1-VL1,

2H2-VH1-VL2 и 2H2-VH1-VL3 на основании результатов вестерн-блоттинг анализа, в котором полоса 1 представляет 2H2-V_{H1}-V_{L1}, полоса 2 представляет 2H2-V_{H1}-V_{L2}, полоса 3 представляет 2H2-V_{H1}-V_{L3}, полоса 4 представляет 2H2-V_{H2}-V_{L1}, полоса 5 представляет 2H2-V_{H2}-V_{L2}, полоса 6 представляет 2H2-V_{H2}-V_{L3}, полоса 7 представляет 2H2-V_{H3}-V_{L1}, полоса 8 представляет 2H2-V_{H3}-V_{L2}, полоса 9 представляет 2H2-V_{H3}-V_{L3}, полоса 10 представляет 2H2-V_{H4}-V_{L4} и полоса А представляет белок-содержащую среду, которая не была центрифугирована, полоса В представляет белок-содержащую среду, которая была центрифугирована для удаления дебриса с последующим
 10 фильтрованием через фильтр 0,22 мкм, и полоса С представляет белок Fc. Белок Fc использовали в качестве контрольной группы.

На Фиг. 10 показаны графики, иллюстрирующие специфичность гуманизированного антитела 2H2-V_{H1}-V_{L1} (то есть hPMAb22) к белкам PAUF. PMAb83 (то есть человеческое антитело) использовали в качестве сравнительной группы.

На Фиг. 11 показаны графики, иллюстрирующие аффинность hPMAb22 к белкам PAUF, на основании результатов анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR). PMAb83 (то есть человеческое антитело) использовали в качестве сравнительной группы.

На Фиг. 12 показан график, иллюстрирующий, что hPMAb22, которое представляет собой человеческое антитело hPMAb22 против PAUF, имеет эпитоп, отличный от эпитопа PMAb83, и на графике показаны результаты конкурентного ELISA с меченым биотином PMAb83.

На Фиг. 13 показан график, иллюстрирующий ингибирующее действие hPMAb22 на пролиферацию раковых клеток на основании результатов анализа пролиферации WST-1. В частности, было подтверждено ингибирующее действие hPMAb22 на CFPAC-1 (то есть клеточную линию рака поджелудочной железы). IgG использовали в качестве контрольной группы и PMAb83 использовали в качестве сравнительной группы.

На Фиг. 14 показана диаграмма, иллюстрирующая ингибирующее действие hPMAb22 на миграцию раковых клеток на основании результатов анализа миграции. В частности, было подтверждено ингибирующее действие hPMAb22 на АМСРАС06 (то есть на клетки рака поджелудочной железы, полученные от пациента с раком поджелудочной железы) и OVCAR-5 (то есть на линию клеток рака яичника). PMAb83 использовали в качестве сравнительной группы.

На Фиг. 15 показаны диаграммы, иллюстрирующие ингибирующее действие hPMAb22 на инвазию раковых клеток на основании результатов анализа инвазии. В частности, было подтверждено ингибирующее действие hPMAb22 на АМСРАС04 или на АМСРАС06 (то есть на клетки рака поджелудочной железы, полученные от пациента с раком поджелудочной железы) и на OVCAR-5 (то есть на линию клеток рака яичника). PMAb83 использовали в качестве сравнительной группы.

На Фиг. 16 показаны графики, иллюстрирующие противоопухолевый эффект hPMAb22 in vivo и на основании графиков было подтверждено, что объем и масса опухолей уменьшались при введении hPMAb22. Gemzar[®] (гемцитабин) использовали в качестве сравнительной группы.

Лучший вариант осуществления изобретения

Для достижения вышеуказанных целей в одном аспекте настоящего изобретения предлагается антитело, которое связывается с белком активирующего фактора аденокарциномы поджелудочной железы (PAUF).

В настоящем изобретении авторы изобретения разработали антитела, каждое из

которых включает переменную область тяжелой цепи, которая включает CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 2, 39 и CDR3 тяжелой цепи из SEQ ID NO: 3, 4 или 30; и переменную область легкой цепи, которая включает CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 5, CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 6 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 7 или 31. Было подтверждено, что эти антитела проявляют значительно более высокую аффинность и специфичность к белкам PAUF по сравнению с обычными антителами против PAUF, ингибируют пролиферацию, миграцию и инвазию различных видов рака, таких как рак поджелудочной железы, рак яичников и т.д., и ингибируют рост раковых опухолей *in vivo*.

При использовании здесь термин "белок активирующего фактора аденокарциномы поджелудочной железы (PAUF)" относится к белку, участвующему в развитии и метастазировании опухоли. Сообщалось, что белки PAUF сверхэкспрессируются в раковых клетках, таких как рак поджелудочной железы, рак яичников, рак толстой кишки, рак шейки матки и т.д. и, таким образом, эти белки могут являться мишенью для диагностики, лечения и т.д. рака (Cancer Sci. 2009 May, 100(5): 828-36; Biochem Biophys Res Commun. 2014 Nov, 454(1): 144-50).

При использовании здесь термин "антитело" относится к молекуле белка, которая действует как рецептор, способный специфично распознавать антигены, и включает молекулу иммуноглобулина, которая иммунологически взаимодействует с определенным антигеном. Антитела по настоящему изобретению могут включать все поликлональные антитела, моноклональные антитела, полные антитела и фрагменты антител, а также химерные антитела и двухвалентные или биспецифические молекулы (например биспецифические антитела), диатела, триатела и тетраатела. Кроме того, антитела по настоящему изобретению включают одноцепочечное антитело, обладающее функцией связывания с неонатальными Fc-рецепторами (FcRn), scab, производные константной области антитела и искусственные антитела на основе белкового каркаса.

Полное антитело имеет структуру с двумя полноразмерными легкими цепями и двумя полноразмерными тяжелыми цепями, где каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью дисульфидной связью. Полное антитело включает IgA, IgD, IgE, IgM и IgG, где IgG включает IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 в качестве подтипов.

Фрагмент антитела относится к фрагменту, обладающему антигенсвязывающей функцией, и включает Fc, Fd, Fab, Fab', Fv, F(ab')₂ и т.д. Fc относится к хвостовой части антитела, которая взаимодействует с рецептором клеточной поверхности, называемым Fc-рецептором. Fd относится к части тяжелой цепи, включенной в фрагмент Fab, а F(ab')₂ относится к фрагменту, включающему Fd, Fab, Fab' и Fv. Fab имеет структуру, состоящую из переменных областей легкой и тяжелой цепей, константной области легкой цепи и первой константной области тяжелой цепи (домен CH1), и Fab имеет один антигенсвязывающий сайт. Fab' отличается от Fab тем, что он имеет шарнирную область, включающую по меньшей мере один остаток цистеина на С-конце домена CH1 тяжелой цепи. Антитело F(ab')₂ образуется путем образования дисульфидной связи остатком цистеина в шарнирном участке Fab'. Переменный фрагмент (Fv) относится к минимальному фрагменту, имеющему только переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи. Фрагмент антитела Fv (dsFv), стабилизированный дисульфидом, характеризуется тем, что переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи связаны дисульфидной связью, тогда как одноцепочечный Fv (scFv) обычно характеризуется тем, что переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи соединены ковалентной связью.

посредством пептидного линкера. Эти фрагменты антител могут быть получены с помощью протеазы (например, Fab может быть получен путем рестрикционного расщепления полноразмерных антител папаином, а фрагмент F(ab')₂ может быть получен путем расщепления пепсином) и, предпочтительно, может быть получен посредством

технологии генетической рекомбинации.

Обычно иммуноглобулин имеет тяжелую цепь и легкую цепь, и каждая тяжелая цепь и легкая цепь включает константную область и переменную область. Переменные области легкой цепи и тяжелой цепи включают три гиперпеременные области, называемые областями, определяющими комплементарность (далее "CDR"), и четыре каркасные области (далее "FR"). CDR каждой цепи главным образом играет роль связывания с эпитопом антигена, и обычно называется CDR1, CDR2 и CDR3, последовательно начиная с N-конца. Кроме того, FR каждой цепи может называться FR1, FR2, FR3 и FR4, последовательно начиная с N-конца.

В настоящем изобретении переменная область тяжелой цепи может быть названа "V_H"; переменная область легкой цепи может быть названа "V_L"; CDR тяжелой цепи может быть названа "V_H-CDR1", "V_H-CDR2" и "V_H-CDR3"; CDR легкой цепи может быть названа "V_L-CDR1", "V_L-CDR2" и "V_L-CDR3"; FR тяжелой цепи может быть названа "V_H-FR1", "V_H-FR2", "V_H-FR3" и "V_H-FR4"; и FR легкой цепи может быть названа "V_L-FR1", "V_L-FR2", "V_L-FR3" и "V_L-FR4".

Кроме того, когда антитела по настоящему изобретению содержат константную область, они могут содержать константные области, полученные из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM, или их комбинацию, или их гибрид.

При использовании здесь термин "комбинация" означает, что полипептид, кодирующий одноцепочечную константную область иммуноглобулина такого же происхождения, соединен с одноцепочечным полипептидом другого происхождения с образованием димера или мультимера. Например, димер или мультимер может быть образован двумя или более константными областями, выбранными из группы, состоящей из константных областей IgG, IgA, IgD, IgE и IgM.

При использовании здесь термин "гибрид" означает, что последовательности, соответствующие двум или более константным областям тяжелой цепи иммуноглобулина разного происхождения, присутствуют в одной цепи константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Например, возможные гибридные формы могут состоять из одного-четырех доменов, выбранных из группы, состоящей из CH1, CH2, CH3 и CH4 IgG, IgA, IgD, IgE и IgM.

Кроме того, в настоящем изобретении антитела могут иметь одинаковое происхождение или разное происхождение в отношении их переменных областей и константных областей, и происхождение CDR и переменных областей и константных областей, за исключением CDR, может быть одинаковым или разным.

При использовании здесь термин "антитело, которое специфично связывается с белком активирующего фактора аденокарциномы поджелудочной железы (PAUF)", относится к антителу, которое может связываться с белком PAUF и, таким образом, ингибировать активность белка PAUF.

В частности, антитело, которое специфично связывается с белком активирующего фактора аденокарциномы поджелудочной железы (PAUF), может представлять собой мышинное антитело, химерное антитело или гуманизированное антитело.

В частности, каждое из антител по настоящему изобретению может включать: переменную область тяжелой цепи, которая включает CDR1 тяжелой цепи SEQ ID

NO: 1; CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 2, 39; и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 3, 4 или 30; и

вариабельную область легкой цепи, которая включает CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 5; CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 6; и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 7 или 31, но антитела не ограничены ими.

Кроме того, каждое из антител по настоящему изобретению может включать: вариабельную область тяжелой цепи, которая состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, 28 или 37; и

вариабельную область легкой цепи, которая состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18, 29 или 38, но антитела не ограничены ими.

Кроме того, каждое из антител по настоящему изобретению может содержать вариабельную область тяжелой цепи антитела, которая включает:

каркасную область FR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 8, 19 или 32; FR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 9 или 20; FR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 10, 21 или 33; и FR4 тяжелой цепи SEQ ID NO: 11, 12, 22, 23 или 34; и

вариабельную область легкой цепи антитела, которая включает FR1 легкой цепи SEQ ID NO: 13, 24 или 35; FR2 легкой цепи SEQ ID NO: 14 или 25; FR3 легкой цепи SEQ ID NO: 15 или 26; и FR4 легкой цепи SEQ ID NO: 16, 27 или 36,

но антитела не ограничены ими.

В одном воплощении настоящего изобретения каждое из антител по настоящему изобретению, обладающее улучшенной аффинностью и специфичностью по сравнению с существующими антителами PAUF, может конкретно включать:

вариабельную область тяжелой цепи, которая включает CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 1; CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 2, 39; и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 3; и

вариабельную область легкой цепи, которая включает CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 5; CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 6; и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 7;

вариабельную область тяжелой цепи, которая включает CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 1; CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 2, 39; и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 4; и

вариабельную область легкой цепи, которая включает CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 5; CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 6; и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 7;

FR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 8; FR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 9; FR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 10; и FR4 тяжелой цепи SEQ ID NO: 11; и вариабельную область легкой цепи антитела, которая включает FR1 легкой цепи SEQ ID NO: 13; FR2 легкой цепи SEQ ID NO: 14; FR3 легкой цепи SEQ ID NO: 15; и FR4 легкой цепи SEQ ID NO: 16; или

FR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 8; FR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 9; FR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 10; и FR4 тяжелой цепи SEQ ID NO: 12; и вариабельную область легкой цепи антитела, которая включает FR1 легкой цепи SEQ ID NO: 13; FR2 легкой цепи SEQ ID NO: 14; FR3 легкой цепи SEQ ID NO: 15; и FR4 легкой цепи SEQ ID NO: 16; и, более конкретно,

вариабельную область тяжелой цепи, которая включает тяжелую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 17; и вариабельную область легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 18, но антитела не ограничены ими.

В одном воплощении настоящего изобретения антитело, которое включает вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18, называли "2H2" или "сРMAb22".

Кроме того, каждое из антител по настоящему изобретению может конкретно включать:

вариабельную область тяжелой цепи, которая включает CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 1; CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 2, 39; и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 3; и вариабельную область легкой цепи, которая включает CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 5; CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 6; и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 7;

5 вариабельную область тяжелой цепи, которая включает CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 1; CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 2, 39; и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 4; и вариабельную область легкой цепи, которая включает CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 5; CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 6; и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 7;

10 FR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 19; FR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 20; FR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 21; и FR4 тяжелой цепи SEQ ID NO: 22; и вариабельную область легкой цепи антитела, которая включает FR1 легкой цепи SEQ ID NO: 24; FR2 легкой цепи SEQ ID NO: 25; FR3 легкой цепи SEQ ID NO: 26; и FR4 легкой цепи SEQ ID NO: 27; или

15 FR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 19; FR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 20; FR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 21; и FR4 тяжелой цепи SEQ ID NO: 23; и вариабельную область легкой цепи антитела, которая включает FR1 легкой цепи SEQ ID NO: 24; FR2 легкой цепи SEQ ID NO: 25; FR3 легкой цепи SEQ ID NO: 26; и FR4 легкой цепи SEQ ID NO: 27; и более конкретно,

вариабельную область тяжелой цепи, которая включает тяжелую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 28; и вариабельную область легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 29, но антитела не ограничены ими.

20 В одном воплощении настоящего изобретения антитело, которое включает вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29, было названо "hPMAb22".

25 Кроме того, каждое из антител по настоящему изобретению может конкретно содержать:

вариабельную область тяжелой цепи, которая включает CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 1; CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 2, 39; и CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 30; и вариабельную область легкой цепи, которая включает CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 5; CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 6; и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 31; или

30 FR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 32; FR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 9; FR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 33; и FR4 тяжелой цепи SEQ ID NO: 34; и вариабельную область легкой цепи антитела, которая включает FR1 легкой цепи SEQ ID NO: 35; FR2 легкой цепи SEQ ID NO: 14; FR3 легкой цепи SEQ ID NO: 15; и FR4 легкой цепи SEQ ID NO: 36; и более конкретно,

вариабельную область тяжелой цепи, которая включает тяжелую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 37; и вариабельную область легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 38, но антитела не ограничены ими.

40 В одном воплощении настоящего изобретения антитело, которое включает вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 37, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 38, было названо "20C5" или "сPMAb205".

В конкретном воплощении настоящего изобретения авторы изобретения разработали мышинные антитела (то есть 2H2 и 20C5), которые связываются с белками PAUF, их химерные антитела (есть сPMAb22 и сPMAb205) и их гуманизированные антитела (есть hPMAb22), и подтвердили, что эти антитела могут связываться с белками PAUF с более высокой специфичностью и аффинностью, чем существующие PAUF-антитела (Фиг. 1, 3, 4 и 8-11). Кроме того, авторы настоящего изобретения подтвердили, что эти антитела

могут ингибировать пролиферацию, миграцию и инвазию раковых клеток в линиях клеток рака яичников, а также в линиях клеток рака поджелудочной железы и раковых клетках поджелудочной железы, полученных от пациентов с раком поджелудочной железы, и также могут ингибировать рост рака поджелудочной железы *in vivo*. Кроме того, они подтвердили, что противораковые терапевтические эффекты этих антител были аналогичны или лучше, чем у PMAb83, которое представляет собой существующее человеческое антитело, специфичное к белкам PAUF (Фиг. 5-7 и 13-16).

Эти результаты позволяют предположить, что антитела по настоящему изобретению, которые связываются с белками PAUF, могут эффективно использоваться в областях, где требуется распознавание белков PAUF, например в диагностике, лечении и т.д. заболеваний, при которых сверхэкспрессируются белки PAUF.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен полинуклеотид, который кодирует антитело по настоящему изобретению, экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид, и трансформант, в который введен экспрессионный вектор. В частности, определение антитела является таким же, как описано выше.

В настоящем изобретении экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий антитело, может представлять собой вектор, который может реплицировать и/или экспрессировать полинуклеотид в эукариотических или прокариотических клетках, включая клетки млекопитающих (например клетки людей, обезьян, кроликов, крыс, хомяков, мышей и т.д.), растительные клетки, дрожжевые клетки, клетки насекомых и клетки бактерий (например *E.coli*, и т.д.) и предпочтительно может быть функционально связан с подходящим промотором, так что нуклеотид может экспрессироваться в клетке-хозяине, и может содержать по меньшей мере один селектируемый маркер, но экспрессионный вектор не ограничивается ими. Например, экспрессионный вектор может находиться в форме, в которой полинуклеотид вводя в фаг, плазмиду, космиду, мини-хромосому, вирус, ретровирусный вектор и т.д.

Экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий антитело, может представлять собой экспрессионный вектор, который содержит полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или легкую цепь антитела, или экспрессионный вектор, который содержит полинуклеотид, кодирующий и тяжелую цепь, и легкую цепь.

В настоящем изобретении трансформант, в который введен экспрессионный вектор, может представлять собой клетку, трансформированную путем введения экспрессионного вектора, включая клетки бактерий (например *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*, и т.д.); дрожжевые клетки; клетки гриба (например *Pichia pastoris*, и т.д.); клетки насекомых (например *Drosophila*, *Spodoptera* (Sf9) и т.д.); клетки животных (например клетки яичника китайского хомяка (CHO), COS, миеломы мыши (NSO), 293T, клетки bow меланомы, HT-1080, клетки почки новорожденного хомячка (BHK), эмбриональные клетки почки человека (HEK), PERC.6 (клетки сетчатки человека) и т.д.); и растительные клетки, но трансформант не ограничен ими.

При использовании здесь термин "введение" относится к способу доставки вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий антитело, в клетку-хозяина. Введение может быть достигнуто такими известными в данной области методами, как соосаждение ДНК фосфатом кальция, DEAE-декстран-опосредованная трансфекция, полибрен-опосредованная трансфекция, электропорация, микроинъекция, слияние липосом, липофектаминовый метод и слияние протопласта. Кроме того, при использовании здесь, термин "трансфекция" относится к доставке объекта в клетки с использованием вирусных частиц посредством инфекции. Кроме того, векторы могут быть введены в клетки-хозяева посредством генной бомбардировки и т.д. В настоящем изобретении

термин "введение" может быть использован взаимозаменяемо с термином "трансформация".

В еще одном аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая композиция для предотвращения или лечения рака, содержащая антитело.

5 Антитело демонстрирует чрезвычайно высокую аффинность и специфичность в отношении белков PAUF, сверхэкспрессируемых при раке. Антитело может ингибировать пролиферацию, миграцию и инвазию различных видов рака (например рака поджелудочной железы, рака яичников и т.д.) и, кроме того, может ингибировать рост рака *in vivo*. Следовательно, антитело по настоящему изобретению можно эффективно
10 использовать для предупреждения или лечения заболеваний, при которых белки PAUF сверхэкспрессируются, таких как рак. В частности, определение антитела является таким же, как описано выше.

При использовании здесь термин "рак" относится к опухоли, которая аномально выросла из-за автономного разрастания ткани организма, и включает в себя, без
15 ограничения, любой тип рака, если он может быть предотвращен или вылечен антителом по настоящему изобретению. Конкретные примеры рака могут включать рак поджелудочной железы, рак желудка, рак толстой кишки, рак желчных путей, рак пищевода, рак прямой кишки, рак полости рта, рак глотки, рак гортани, рак легких, рак толстой кишки, рак молочной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак
20 эндометрия, рак предстательной железы, рак яичка, рак мочевого пузыря, рак почки, рак печени, рак костей, рак соединительной ткани, рак кожи, рак головного мозга, рак щитовидной железы, лейкоз, болезнь Ходжкина, лимфому и множественную миелому клеток крови.

При использовании здесь термин "профилактика" относится к любому действию, приводящему к подавлению или задержке возникновения рака путем введения
25 вышеуказанной композиции, и термин "лечение" относится к любому действию, приводящему к улучшению или благоприятным изменениям симптомов рака путем введения вышеуказанной композиции.

Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель, и носитель может содержать не встречающийся в природе
30 носитель.

При использовании здесь термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к носителю или растворителю, который не раздражает организм и не влияет на биологическую активность и свойства вводимого соединения. В качестве
35 фармацевтического носителя, подходящего для композиций, приготовленных в виде жидких растворов, выбирают один или более из солевого раствора, стерильной воды, раствора Рингера, забуференного физиологического раствора, раствора альбумина для инъекций, раствора декстрозы, раствора мальтодекстрина, глицерина, этанола и их смеси, которые подходят для стерилизации и применения *in vivo*, могут быть смешаны
40 для использования. При необходимости могут быть добавлены другие общепринятые добавки, такие как антиоксидант, буфер, бактериостатический агент и т.д. Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть приготовлена в виде инъекционных составов (например водных растворов, суспензий, эмульсий и т.д.), пилюль, капсул, гранул и таблеток путем дополнительного добавления разбавителя, диспергирующего вещества, поверхностно-активного вещества, связующего вещества и смазки.

Фармацевтическая композиция может быть приготовлена в любой форме, выбранной из группы, состоящей из таблеток, пилюль, порошков, гранул, капсул, суспензий,

растворов, эмульсий, сиропов, стерильных водных растворов, неводных растворителей, суспензий, лиофилизированных препаратов и суппозиторий, и может находиться в виде различных форм для перорального или парентерального введения. Композиции могут быть приготовлены с использованием общепринятого разбавителя или

5 эксципиента, такого как наполнитель, добавка, связующий агент, увлажнитель, разрыхлитель, поверхностно-активное вещество и т.д. Твердые композиции для перорального введения могут включать таблетки, пилюли, порошки, гранулы, капсулы и т.д., и эти твердые композиции могут быть получены посредством добавления по

10 меньшей мере одного эксципиента (например крахмала, карбоната кальция, сахарозы или лактозы, желатина и т.д.). Кроме того, смазывающее вещество (например стеарат магния, тальк и т.д.) можно использовать в дополнение к простому эксципиенту. Жидкие композиции для перорального введения могут включать суспензии, жидкие лекарственные средства для внутреннего применения, эмульсии, сиропы и т.д., а также

15 можно использовать различные эксципиенты, такие как увлажнители, подсластители, ароматизаторы и консерванты, в дополнение к простым разбавителям, таким как вода и вазелиновое масло. Композиции для парентерального введения могут включать стерильные водные растворы, неводные растворители, суспензии, эмульсии, лиофилизированные препараты, суппозитории и т.д. Примеры неводных растворителей и суспензий могут включать растительные масла (например пропиленгликоль,

20 полиэтиленгликоль и оливковое масло), инъецируемый эфир (например этилолеат) и т.д. Примеры основ для суппозиторий могут включать витепсол, макрогол, твин 61, масло какао, лаурин, глицерожелатин и т.д.

Композиция по настоящему изобретению может быть введена в фармацевтически эффективном количестве. При использовании здесь, термин "фармацевтически

25 эффективное количество" относится к количеству, достаточному для лечения заболеваний с приемлемым соотношением польза/риск, применимым к медицинскому лечению, и уровень эффективной дозы может быть определен на основе факторов, включающих тип субъекта, тяжесть заболевания, возраст, пол, вид заболевания, активность лекарственного средства, чувствительность к лекарственному средству,

30 время введения, путь введения и скорость растворения, продолжительность лечения, а также факторы, включая лекарственное(ые) средство(а), используемое(ые) одновременно в комбинации, и другие факторы, хорошо известные в области медицины. Композиция по настоящему изобретению может быть введена в виде отдельного терапевтического агента, в комбинации с другими терапевтическими агентами,

35 последовательно или одновременно с обычным(и) терапевтическим(и) агентом(ами), и может быть введена один или несколько раз. Важно вводить фармацевтическую композицию в минимальном количестве, которое может обеспечить максимальный эффект без побочных эффектов, принимая во внимание все факторы, описанные выше, и фармацевтически эффективное количество может быть легко определено специалистом

40 в данной области.

В конкретном воплощении настоящего изобретения подтверждено, что антитело, которое связывается с белками PAUF с высокой специфичностью и аффинностью, может ингибировать пролиферацию, миграцию и инвазию раковых клеток в клеточных линиях рака яичников, а также в клеточных линиях рака поджелудочной железы и в клетках

45 рака поджелудочной железы, полученных от пациентов с раком поджелудочной железы, и, кроме того, могут ингибировать рост рака поджелудочной железы *in vivo*. Кроме того, было подтверждено, что терапевтический эффект антитела против рака был аналогичен или превосходил эффект PMAb83 (то есть существующего специфического к

белку PAUF человеческого антитела (Фиг. 5-7 и 13-16).

Эти результаты позволяют предположить, что антитело, которое может связываться с белком PAUF, по настоящему изобретению, можно эффективно использовать для предупреждения или лечения рака.

5 Еще в одном аспекте настоящего изобретения предложен способ предупреждения или лечения рака, включающий введение описанных выше антител субъекту.

В частности, определения антител, рака, предупреждения и лечения являются такими же, как описано выше.

10 При использовании здесь термин "субъект" включает млекопитающих (например крыс, крупный рогатый скот, свиней, овец, кур, собак, людей и т.д.), птиц и т.д., у которых развился рак или которые подвержены риску развития рака, но любой субъект, у которого рак можно лечить путем введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включен без ограничения.

15 В способе предупреждения или лечения рака по настоящему изобретению путь введения и способ введения композиции конкретно не ограничены, и можно использовать любой путь введения и способ введения, при условии что композиция может достигать целевых областей.

20 В частности, композицию можно вводить различными путями, включая пероральный и парентеральный. Неограничивающие примеры путей введения могут включать пероральное, ректальное, местное, внутривенное, внутривенное, внутримышечное, внутриартериальное, трансдермальное, интраназальное, ингаляционное введение и т.д. Кроме того, композицию можно вводить с помощью любого устройства, способного доставлять активный агент в клетку-мишень.

25 Еще в одном аспекте настоящего изобретения предложен способ ингибирования пролиферации, миграции или инфильтрации раковых клеток, который включает введение антитела по настоящему изобретению.

В частности, определения антитела, субъекта и рака являются такими же, как описано выше.

30 Антитело демонстрирует чрезвычайно высокую аффинность и специфичность в отношении белка PAUF, сверхэкспрессируемого при раке. Антитело может ингибировать пролиферацию, миграцию и инвазию различных видов рака (например рака поджелудочной железы, рака яичников и т.д.) и, кроме того, может ингибировать рост рака *in vivo*. Следовательно, антитело по настоящему изобретению можно эффективно использовать для предупреждения или лечения раковых клеток.

35 Еще в одном аспекте настоящего изобретения предложен конъюгат антитело-лекарственное средство, в котором лекарственное средство конъюгировано с антителом по настоящему изобретению.

В частности, определение антитела является таким же, как описано выше.

40 При использовании здесь термин "конъюгат антитело-лекарственное средство" относится к веществу в форме, в которой лекарственное средство конъюгировано с антителом, с использованием специфичности к цели, отсутствия токсичности во время циркуляции в крови и фармакокинетические преимущества антитела. Такой конъюгат антитело-лекарственное средство обычно включает в себя 3 вида составляющих элементов (то есть моноклональное антитело-линкер-лекарственное средство) и может 45 улучшать терапевтический эффект антитела, доставляя лекарственное средство к клеткам, на которые нацелены антитела, в частности к раковым клеткам.

При использовании здесь термин "лекарственное средство" относится к веществу, которое прямо или опосредованно конъюгировано с антителом для обеспечения лечения

заболевания, на которое эффективно нацелено антитело. Лекарственные средства, которые могут быть конъюгированы с антителом, включают радионуклиды, лекарственные средства, лимфокины, токсины, биспецифические антитела и т.д. Кроме того, примеры радионуклидов могут включать ^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 и т.д., но радионуклиды не ограничены ими. Кроме того, примеры лекарственных средств или токсинов могут включать этопозид, тенипозид, адриамицин, дауномицин, карминомицин, аминоптерин, дактиномицин, митомицины, цисплатин и аналоги цисплатина, блеомицины, эсперамицины, 5-фторурацил, мелфалан, азотистый иприт и т.д., но лекарственные средства или токсины, которые могут быть конъюгированы с антителами по настоящему изобретению, не ограничены ими.

Конъюгат антитело-лекарственное средство может быть получен с использованием способа получения различных конъюгатов антитело-лекарственное средство, известного в данной области.

Еще в одном аспекте настоящего изобретения предлагается композиция для диагностики рака, содержащую антитело по настоящему изобретению.

В частности, определения антитела и рака являются такими же, как описано выше.

Композиция для диагностики рака по настоящему изобретению содержит различные виды антител, которые могут специфично связываться с белками PAUF, которые сверхэкспрессируются в различных типах раковых клеток, и, таким образом, композиция для диагностики рака по настоящему изобретению может быть эффективно использована для диагностики заболеваний, связанных с наличием/отсутствием экспрессии или с уровнем экспрессии белков PAUF (например рака).

Еще в одном аспекте настоящего изобретения предложен набор для диагностики рака, содержащий указанную композицию.

В частности, определения композиции и рака являются такими же, как описано выше.

Набор для диагностики рака по настоящему изобретению может быть составлен путем дополнительного включения композиции, содержащей один или несколько видов других компонентов, раствора или устройства, подходящего для метода анализа.

Еще в одном аспекте настоящего изобретения предложен способ диагностики рака, который включает в себя обнаружение белков PAUF в биологическом образце, выделенном из субъекта с подозрением на наличие рака, посредством взаимодействия антиген-антитело с использованием антитела по настоящему изобретению.

В частности, определения антитела, субъекта и рака являются такими же, как описано выше.

Поскольку известно, что белки PAUF сверхэкспрессируются в различных типах раковых клеток, антитело по настоящему изобретению, которое связывается с белком PAUF с высокой специфичностью и аффинностью, можно эффективно использовать для диагностики заболеваний, связанных с наличием/отсутствием экспрессии или с уровнем экспрессии белка PAUF (например рака).

В способе диагностики рака может обнаружить белки PAUF путем взаимодействия PAUF-специфичного антитела по настоящему изобретению с биологическим образцом, выделенным от субъекта с подозрением на наличие рака, с последующим обнаружением образования комплекса антиген-антитело, посредством чего можно диагностировать рак.

В частности, способ диагностики рака может представлять собой способ, который включает (а) обработку антителом биологического образца, выделенного от субъекта с подозрением на наличие рака, и обнаружение белков PAUF посредством взаимодействия антиген-антитело, и (б) сравнение уровня белков PAUF, обнаруженных

в (а) с уровнем в контрольной группе, и определение субъекта как ракового пациента, если уровень белков PAUF выше уровня контрольной группы.

При использовании здесь термин "биологический образец" может включать ткани, клетки, цельную кровь, сыворотку, плазму, образцы тканей после вскрытия (мозг, кожа, лимфатические узлы, спинной мозг и т.д.), супернатант клеточной культуры, разрушенные эукариотические клетки, бактериальные системы экспрессии и т.д., но биологический образец не ограничен ими. Присутствие белка PAUF или наличие рака можно подтвердить посредством взаимодействия этих биологических образцов, с помощью различных манипуляций или без них, с антителами по настоящему изобретению.

При использовании здесь термин "комплекс антиген-антитело" относится к конъюгату антигена белка PAUF в образце и антитела по настоящему изобретению, который распознает антиген. Образование комплекса антиген-антитело можно обнаружить любым методом, таким как колориметрический метод, электрохимический метод, флуориметрический метод, люминометрический метод, метод подсчета частиц, визуальная оценка, сцинтилляционные измерения и т.д. Однако способы обнаружения образования комплекса антиген-антитело этим не ограничены, и возможны различные приложения.

Различные маркеры могут быть использованы для обнаружения комплекса антиген-антитело. Конкретные примеры маркеров могут включать ферменты, флуоресцентные вещества, лиганды, люминесцентные вещества, микрочастицы, радиоизотопы и т.д., но маркеры не ограничены ими. В частности, примеры ферментов, которые можно использовать в качестве маркеров для обнаружения, могут включать ацетилхолинэстеразу, щелочную фосфатазу, β -D-галактозидазу, пероксидазу хрена, β -лактамазу и т.д.; примеры флуоресцентных веществ могут включать флуоресцеин, Eu^{3+} , Eu^{3+} хелаты, Eu^{3+} крипаты и т.д.; примеры лигандов могут включать производные биотина и т.д.; примеры люминесцентных веществ могут включать сложные эфиры акридиния, производные изолюминола и т.д.; примеры микрочастиц могут включать коллоидное золото, окрашенный латекс и т.д., и примеры радиоизотопов могут включать ^{57}Co , ^3H , ^{125}I , реагент ^{125}I -Бонтона Хантера и т.д.

Еще в одном аспекте настоящего изобретения предложен способ скрининга веществ для предупреждения или лечения рака, который включает (а) обработку раковых клеток веществом-кандидатом для предупреждения или лечения рака; (б) измерение уровня белка активирующего фактора аденокарциномы поджелудочной железы (PAUF) в раковых клетках, обработанных веществом-кандидатом, с использованием антитела по настоящему изобретению; и (в) определение, может ли вещество-кандидат, который был использован на стадии (а), применяться для предупреждения или лечения рака, когда уровень белка PAUF на стадии (б) ниже, чем уровень в раковых клетках, не обработанных веществом-кандидатом.

В частности, определения антител, белка PAUF и рака являются такими же, как описано выше.

При использовании здесь термин "вещество-кандидат для предупреждения или лечения рака" представляет собой вещество, которое, как ожидается, способно лечить рак, и можно использовать без ограничения любое вещество, способное прямо или косвенно облегчать проявления рака или улучшать состояние при раке. Вещество-кандидат включает все вещества, которые, как ожидается, можно использовать для лечения, такие как соединения, гены, белки и т.д.

В настоящем изобретении стадия (а) лечения раковых клеток веществом-кандидатом для предупреждения или лечения рака может быть выполнена с использованием способа, известного в данной области техники. В конкретном воплощении раковые клетки могут быть обработаны веществом-кандидатом и культивироваться вместе с ним, или
 5 вещество-кандидат может быть применен путем введения его в живой организм, содержащий раковые клетки, но способ не ограничен этим, и специалист в данной области техники сможет использовать способ, подходящий для цели настоящего изобретения.

Кроме того, стадия (б) измерения уровня белка PAUF может быть выполнена с
 10 использованием любого способа, известного специалисту в данной области. В конкретном воплощении может быть использован вестерн-блот, анализ ко-иммунопреципитации, иммуноферментный анализ (ELISA), гистологическое иммуноокрашивание, анализ с помощью проточной цитометрии и т.д., но способ не ограничен ими, и специалист в данной области техники сможет использовать способ,
 15 подходящий для цели настоящего изобретения.

В конечном итоге, стадия (в) относится к определению того, может ли вещество-кандидат использоваться для предупреждения и лечения рака и вещество-кандидат, который может снижать уровень белка PAUF, который сверхэкспрессируется в раковых клетках и способствует пролиферации, миграции, инвазии, росту и т.д. раковых клеток,
 20 может быть использован в качестве вещества для предупреждения и лечения рака.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Ниже настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на следующие Примеры. Однако эти Примеры предназначены только для иллюстративных целей, и объем изобретения не ограничен этими Примерами.

Пример 1. Обнаружение и подтверждение мышинных антител против белка PAUF
 Пример 1-1. Обнаружение 2H2 и 20C5

Для разработки антитела, нацеленного на белок PAUF, сначала использовали мышинное моноклональное антитело, которое связывается с белком PAUF.

В частности, мышинное антитело против белка PAUF обнаруживали следующим
 30 способом. После инъекции мыши белка PAUF продуцировалось антитело к белку PAUF, и из селезенки мыши были выделены В-лимфоциты. Выделенные лимфоциты подвергали многократному разведению, так что только один В-лимфоцит был помещен в каждую лунку 96-луночного планшета, покрытого белком PAUF. Затем В-лимфоциты, связавшиеся с белком PAUF, подвергали скринингу с использованием меченых HRP
 35 антимышиных антител.

В результате были обнаружены четыре вида мышинных антител против белка PAUF (то есть 2H2, 4E6, 11G6 и 20C5), и последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепей, CDR и FR описаны в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 Аминокислотные последовательности 2H2 (мышинное антитело против белка PAUF)

Название антитела	Категория	Последовательность	SEQ ID NO
2H2	Вариабельная область тяжелой цепи (V _H)	QVQLKQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDY YMHVVKQRPEQGLEWIGWIDPENGNTIYDP KFQGKASITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVY YCARRAITTATAWFAYWGQGLTVTVSA	17
	V _H -CDR1	GFNIKDY	1
	V _H -CDR2	IDPENGNT	2
	V _H -CDR3	ARRAITTATAWFA	3
	V _H -CDR3	ARRAITTATAWFAY	4
	V _H -FR1	QVQLKQSGAELVRPGALVKLSCKAS	8
	V _H -FR2	MHVVKQRPEQGLEWIGW	9
	V _H -FR3	IYDPKFQGKASITADTSSNTAYLQLSSLTSEDT AVYYC	10
	V _H -FR4	YWGQGLTVTVSA	11
	V _H -FR4	WGQGLTVTVSA	12
	Вариабельная область Легкой цепи (V _L)	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNLS RTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESG VPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCK QSYNLYTFGAGTKLELK	18
	V _L -CDR1	QSLNLSRTRKNY	5
	V _L -CDR2	WAS	6
	V _L -CDR3	KQSYNLY	7
	V _L -FR1	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSS	13
	V _L -FR2	LAWYQQKPGQSPKLLIY	14
	V _L -FR3	TRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAV YYC	15
	V _L -FR4	TFGAGTKLELK	16

Таблица 2. Аминокислотные последовательности 20C5 (мышиные антитела против белка PAUF)

Название антитела	Категория	Последовательность	SEQ ID NO
20C5	Вариабельная область Тяжелой цепи (V _H)	QVQLKESGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDY YMHWVKQRPEQGLEWIGWIDPEHGNTIYDPK FQGKASLTADTSSNTAYLQLSSLTSEDYAVYY CARRGWLPAWFAYWGQGTLVTVSA	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	IYDPKFQGKASLTADTSSNTAYLQLSSLTSEDY AVYYC	33
	V _H -FR4	WGQGTLVTVSA	34
	Вариабельная область Легкой цепи (V _L)	DIVMTQSPSSSLAVSAGEKVTLSCKSSQSLNSR TRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVP DRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSY NLYTFGGGTKLEIK	38
	V _L -CDR1	QSLNSRTRKNY	5
	V _L -CDR2	WAS	6
	V _L -CDR3	KQSYNLYT	31
	V _L -FR1	DIVMTQSPSSSLAVSAGEKVTLSCKSS	35
	V _L -FR2	LAWYQQKPGQSPKLLIY	14
	V _L -FR3	TRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAV YYC	15
	V _L -FR4	FGGGTKLEIK	36

Пример 1-2. Подтверждение специфичности к белку PAUF

Антитело с самой высокой аффинностью к белку PAUF среди четырех видов антител (2H2, 4E6, 11G6 и 20C5), обнаруженных в примере 1-1, было идентифицировано с использованием следующего метода.

В частности, аффинность антиген-антитела проверяли с помощью непрямого ELISA. Иммунопланшет, покрытый PAUF, обрабатывали четырьмя видами антител (2H2, 4E6, 11G6 и 20C5) в разных концентрациях, и значения OD (оптическая плотность) измеряли с использованием HRP-меченого антимышиного антитела. В частности, с увеличением значения OD увеличивалась аффинность антитела к PAUF. Кроме того, для измерения неспецифического связывания мышинного моноклонального антитела против PAUF, которое обладает высокой аффинностью к PAUF, с другими антигенными белками,

иммунопланшет покрывали PAUF и неспецифическими антигенами, чтобы выполнить непрямой ELISA.

В результате, как показано на Фиг. 1А и 1В, было подтверждено, что два вида антител (2Н2 и 20С5) связываются с белком PAUF с более высокой аффинностью по сравнению с другими антителами, а также что два вида антител (2Н2 и 20С5) обладают чрезвычайно высокой специфичностью к белку PAUF.

Пример 1-3. Подтверждение эпитопов

Для подтверждения эпитопов 2Н2 и 20С5, обнаруженных в Примере 1-1, подтверждали, имеют ли эти антитела тот же эпитоп, что и 8F3, который представляет PAUF-специфическое человеческое моноклональное антитело, раскрытое в патенте KR 10-1098186 (то есть РМАb83).

Конкретно, выполняли конкурентный ELISA с биотин-меченым 2Н2. Иммунопланшет покрывали PAUF, а затем к нему добавляли меченые биотином антитела 2Н2 и антитела, не меченые биотином, в каждом соотношении 1:0, 1:50, 1:100 и 1:200. В качестве вторичного антитела эпитопы анализировали путем измерения значения OD для каждого антитела с использованием стрептавидина-HRP. В частности, когда два антитела имеют похожие эпитопы, значения OD уменьшаются с увеличением концентрации немеченого антитела, тогда как, если эпитопы двух антител отличаются друг от друга, значения OD не изменяются, даже при увеличении концентрации немеченого антитела.

В результате, как показано на Фиг. 2, было подтверждено, что 2Н2 или 20С5 могут распознавать похожие эпитопы, и каждый из них имеет эпитоп, отличный от РМАb83.

Пример 2. Получение химерных антител против белка PAUF и подтверждение их характеристик

Пример 2-1. Получение сРМАb22 или сРМАb205

Чтобы минимизировать отторжение мышинных антител, обнаруженных в Примере 1 (то есть 2Н2 и 20С5), получали химерные антитела, в которых переменная область каждого антитела была сохранена, и только его константная область была заменена человеческим белком.

В частности, была выделена общая мРНК из клеток гибридомы, которые продуцируют мышинные антитела 2Н2 или 20С5, и из нее была синтезирована каждая кДНК для 2Н2 или 20С5. Затем ДНК для 2Н2 или 20С5 получали путем амплификации только переменных областей тяжелой и легкой цепи каждого антитела с помощью ПЦР. Каждую из переменных областей 2Н2 и 20С5, полученных с помощью ПЦР, клонировали в вектор, имеющий константные области тяжелой и легкой цепей человека. Клонирование 2Н2 и 20С5 в векторы подтверждали с помощью ДНК-электрофореза, и последовательности анализировали и разделяли на группы. После удаления клонов, имеющих одинаковые последовательности, выбирали тяжелые и легкие цепи каждого антитела. Выбранные последовательности экспрессировали в клетках НЕК293, и, таким образом, в конечном итоге были получены два вида химерных антител, имеющих переменную область мыши и константную область человека.

В результате были получены сРМАb22 (то есть химерное антитело 2Н2) и сРМАb205 (то есть химерное антитело 20С5). Кроме того, было подтверждено, что переменные области тяжелых и легких цепей, последовательности CDR и FR этих химерных антител были такими же, как у 2Н2 или 20С5, описанных в таблицах 1 и 2 выше.

Пример 2-2. Подтверждение специфичности к белку PAUF

Специфичность сРМАb22 или сРМАb205, полученных в Примерах 2-1, к белку PAUF была подтверждена с использованием следующего метода.

В частности, был проведен непрямой ELISA. Химерные антитела (то есть сРМАb22

и сРМАb205) и человеческое антитело (то есть РМАb83) добавляли в иммунопланшет, который был покрыт белком PAUF-His и множеством неспецифических антигенных белков в концентрации каждого 0 мкг/мл, 1 мкг/мл и 5 мкг/мл, и затем измеряли значения OD с использованием анти-человеческая легкая цепь каппа -HRP антитела (то есть

вторичного антитела).
В результате, как показано на Фиг. 3, было подтверждено, что и сРМАb22, и сРМАb205 обладают чрезвычайно высокой специфичностью к белку PAUF и, в частности, имеют более высокую специфичность к белкам PAUF, чем РМАb83 (то есть существующее человеческое антитело против PAUF).

Пример 2-3. Подтверждение аффинности к белкам PAUF

Специфичность сРМАb22 или сРМАb205, полученных в Примерах 2-1, к белкам PAUF была подтверждена с использованием следующего метода.

В частности, был выполнен непрямой ELISA. Иммунопланшет покрывали белком PAUF-His и обрабатывали каждым антителом в разных концентрациях, и результаты анализировали с использованием в качестве вторичного антитела античеловеческого Fc-HRP, способного распознавать константную область человеческого антитела. В частности, с увеличением концентрации каждого антитела увеличивалось значение OD.

В результате, как показано на Фиг. 4, было подтверждено, что и сРМАb22, и сРМАb205 обладают чрезвычайно высокой специфичностью к белку PAUF и, в частности, имеют более высокую специфичность к белкам PAUF, чем РМАb83 (то есть существующее человеческое антитело против PAUF).

Пример 2-4. Подтверждение ингибирующего действия на пролиферацию раковых клеток

Для подтверждения влияния сРМАb22 (то есть одного из химерных антител, полученных в Примере 2-1) на лечение рака подтверждали ингибирующее действие сРМАb22 на пролиферацию ВхРС-3 (то есть клеточную линию рака поджелудочной железы).

В частности, был проведен анализ пролиферации с помощью WST-1 (водорастворимая тетразолиевая соль 1). Клеточную линию ВхРС-3, имеющую высокий уровень собственной экспрессии PAUF, добавляли в 96-луночный планшет в концентрации 3×10^3 клеток/луночку и 96-луночный планшет обрабатывали IgG, сРМАb22 (химерное антитело) и РМАb83 (человеческое антитело) один раз за двое суток в концентрации 15 мкг/мл, соответственно. Затем 96-луночный планшет обрабатывали WST-1 и измеряли поглощение при 450 нм.

В результате, как показано на Фиг. 5, было подтверждено, что группа, обработанная сРМАb22, обладает более высокой ингибирующей способностью в отношении пролиферации клеток ВхРС-3 по сравнению с группой, обработанной контрольным антителом IgG.

Исходя из вышеприведенных результатов, было подтверждено, что сРМАb22 демонстрирует превосходное ингибирующее действие на пролиферацию раковых клеток и, таким образом, сРМАb22 можно эффективно использовать в качестве вещества для предупреждения или лечения рака.

Пример 2-5. Подтверждение ингибирующего действия на миграцию раковых клеток

Для определения влияния РМАb22 (то есть одного из химерных антител, полученных в Примере 2-1) на лечение рака, подтверждали ингибирующее действие сРМАb22 на миграцию CFPAC-1 (то есть клеточной линии рака поджелудочной железы) и АМСРАС04 (то есть клеток рака поджелудочной железы, полученных от пациента с раком поджелудочной железы).

В частности, анализ миграции выполняли с использованием устройства Transwell. В случае CFPAC-1 (то есть клеточной линии рака поджелудочной железы), 5×10^4 клеток добавляли в верхнюю ячейку Transwell с использованием бессывороточной среды, а затем обрабатывали IgG, сРМАb22 и РМАb83, каждый в концентрации 15 мкг/мл, тогда как в нижнюю ячейку добавляли среду, содержащую сыворотку. Через 24 часа наблюдали миграцию клеток. Кроме того, в случае АМСРАС04 (то есть клеток рака поджелудочной железы, полученных от пациента с раком поджелудочной железы), 6×10^4 клеток добавляли в верхнюю ячейку Transwell с использованием бессывороточной среды, и клетки обрабатывали IgG, сРМАb22 и РМАb83, каждым в концентрации 10 мкг/мл, тогда как среду, содержащую сыворотку, добавляли в нижнюю ячейку Transwell. Через 20 часов наблюдали миграцию клеток.

В результате, как показано на Фиг. 6, было подтверждено, что в группе, обработанной сРМАb22, наблюдалось значительное снижение уровня миграции клеток клеточной линии рака поджелудочной железы или клеток рака поджелудочной железы, полученных от пациента с раком поджелудочной железы, по сравнению с группой, обработанной IgG (то есть антителом контрольной группы). В частности, было подтверждено, что этот уровень миграции был даже ниже уровня группы, обработанной РМАb83.

На основании этих результатов было подтверждено, что сРМАb22 обладает превосходным ингибирующим действием на миграцию раковых клеток по сравнению с РМАb83 (то есть существующим человеческим антителом против PAUF) и, таким образом, сРМАb22 можно эффективно использовать в качестве вещества для предупреждения или лечения рака.

Пример 2-6. Подтверждение ингибирующего действия на инвазию раковых клеток. Для подтверждения влияния сРМАb22 (то есть одного из химерных антител, полученных в Примере 2-1) на лечение рака, определяли ингибирующее действие сРМАb22 на инвазию CFPAC-1 (то есть клеточной линии рака поджелудочной железы) и АМСРАС04 (то есть клеток рака поджелудочной железы, полученных от пациента с раком поджелудочной железы).

В частности, анализ инвазии выполняли с использованием устройства Transwell. В частности, Transwell покрывали матригелем, который может искусственно имитировать внеклеточный матрикс, и наблюдали инвазионную способность клеточной линии рака поджелудочной железы, которая изменялась под воздействием каждого антитела. В случае CFPAC-1 (то есть клеточной линии рака поджелудочной железы), 7×10^4 клеток добавляли в верхнюю ячейку Transwell с использованием бессывороточной среды, а затем обрабатывали IgG, сРМАb22 и РМАb83, каждым в концентрации 15 мкг/мл, в то время как в нижнюю ячейку Transwell добавляли среду, содержащую сыворотку. Через 24 часа наблюдали инвазию клеток. Кроме того, в случае АМСРАС04 (то есть клеток рака поджелудочной железы, полученных от пациента с раком поджелудочной железы), 6×10^4 клеток добавляли в верхнюю ячейку Transwell с использованием бессывороточной среды, и клетки обрабатывали IgG, сРМАb22 и РМАb83, каждым в концентрации 10 мкг/мл, в то время как в нижнюю ячейку Transwell добавляли среду, содержащую сыворотку. Через 20 часов наблюдали инвазию клеток.

В результате, как показано на Фиг. 7, было подтверждено, что в группе, обработанной сРМАb22, наблюдалось значительное снижение уровня инвазии клеток клеточной линии рака поджелудочной железы или клеток рака поджелудочной железы, полученных от пациента с раком поджелудочной железы, по сравнению с группой,

обработанной IgG (то есть антителом контрольной группы). В частности, было подтверждено, что этот уровень инвазии был даже ниже уровня группы, обработанной РМАb83.

На основании этих результатов было подтверждено, что сРМАb22 обладает превосходным ингибирующим действием на инвазию раковых клеток по сравнению с РМАb83 (то есть существующим человеческим антителом против PAUF) и, таким образом, сРМАb22 можно эффективно использовать в качестве вещества для предупреждения или лечения рака.

Пример 3. Получение гуманизированных антител против белка PAUF и

подтверждение их характеристик

Пример 3-1. Получение hРМАb22

Чтобы минимизировать отторжение 2H2 (то есть мышинового антитела, обнаруженного в примере 1) и сРМАb22 (то есть одного из химерных антител, полученных в примере 2), были получены гуманизированные антитела, в которых были сохранены CDR из 2H2 и сРМАb22 (получены от мыши), в то время как переменные области и константные области, исключая CDR, были заменены белком человеческого происхождения.

В частности, были получены три типа гуманизированных антител (то есть 2H2-V_H1/V_L1, 2H2-V_H1/V_L2 и 2H2-V_H1/V_L3) посредством прививки CDR и были подтверждены их аффинность и выход продукции. Для измерения уровней экспрессии гуманизированных антител осуществляли перекрестную сборку трех тяжелых цепей (V_H1, V_H2 и V_H3) и трех легких цепей (V_L1, V_L2 и V_L3), каждой на уровне 5 мл и затем полученные продукты трансфицировали в клетки НЕК293. Затем, через 6 суток, культуральный раствор получали путем сбора среды, содержащей белок антитела, и уровень экспрессии измеряли с помощью вестерн-блоттинга. Кроме того, аффинность этих антител анализировали посредством непрямого ELISA. Иммунопланшеты покрывали PAUF-His и затем обрабатывали каждым антителом в разных концентрациях. Значения OD измеряли, используя в качестве вторичного антитела античеловеческий Fc-HRP, который может распознавать константные области человеческого антитела.

В результате, как показано на Фиг. 8, антитело 2H2-V_H1/V_L1 имеет самую высокую аффинность к белкам PAUF по сравнению с гуманизированными антителами, показывая тем самым, что антитело 2H2-V_H1/V_L1 имеет даже более высокую аффинность, чем сРМАb22 (то есть химерное антитело) или РМАb83 (то есть существующее человеческое антитело против PAUF).

Кроме того, как показано на Фиг. 9, выход продукции 2H2-V_H1/V_L1-антитела составлял 165,5 мг/л, подтверждая тем самым, что антитело 2H2-V_H1/V_L1 имеет значительно более высокий выход продукции, чем антитело 2H2-V_H1/V_L1 (28,25 мг/л) или 2H2-V_H1/V_L3 антитело (42,0 мг/л).

Исходя из этих результатов, антитело 2H2-V_H1/V_L1, которое, как было показано, обладает наибольшей аффинностью к белкам PAUF и самым высоким выходом продукции, было выбрано в качестве гуманизированного антитела 2H2 и сРМАb22 согласно настоящему изобретению, названного "hРМАb22", а последовательности описаны в Таблице 3 ниже.

Таблица 3. Аминокислотные последовательности hPMAb22 (то есть гуманизированного антитела против белка PAUF)

Название антитела	Категория	Последовательность	SEQ ID NO
hPMAb22	Вариабельная область тяжелой цепи (V _H)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIK DYVMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGNT NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRS DDTAVYYCARRAITTATAWFAYWGQGT LVTVSS	28
	V _H -CDR1	GFNIKDY	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	NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRS DDTAVYYC	21
	V _H -FR4	YWGQGT LVTVSS	22
	V _H -FR4	WGQGT LVTVSS	23
	Вариабельная область легкой цепи (V _L)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLN SRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRE SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCKQSYNLYTFGQGTKVEIK	29
	V _L -CDR1	QSLN SRTRKNY	5
	V _L -CDR2	WAS	6
	V _L -CDR3	KQSYNLY	7
	V _L -FR1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS	24
	V _L -FR2	LAWYQQKPGQPPKLLIY	25
	V _L -FR3	TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYC	26
	V _L -FR4	TFGQGT KVEIK	27

Пример 3-2. Подтверждение специфичности к белкам PAUF

Специфичность hPMAb22 (то есть гуманизированного антитела, полученного в Примере 3-1) к белкам PAUF определяли с использованием способа из Примера 2-2.

В результате, как показано на Фиг. 10, было подтверждено, что hPMAb22 обладает очень высокой специфичностью к белкам PAUF и, в частности, даже более высокой специфичностью, чем специфичность PMAb83 (то есть существующего человеческого антитела против PAUF).

Пример 3-3. Подтверждение аффинности к белкам PAUF

Аффинность hPMAb22 (то есть гуманизированного антитела, полученного в Примере 3-1) к белкам PAUF, подтверждали с использованием способа из Примера 2-2.

В частности, аффинность связывания антиген-антитело измеряли с использованием метода SPR (поверхностный плазмонный резонанс). Антиген PAUF иммобилизовали на поверхности тонкой металлической пленки, а антитело разбавляли в разных концентрациях и пропускали над этой металлической поверхностью. Аффинность связывания антиген-антитело измеряли путем измерения времени, необходимого для связывания и диссоциации антигенов и антител.

В результате, как показано на Фиг. 11, было показано, что PMAb83 имеет значение K_d , равное $1,169 \times 10^{-9}$ М и hPMAb22 имеет значение K_d , равное $0,1938 \times 10^{-9}$ М. На основании этих результатов было подтверждено, что hPMAb22 обладает значительно более высокой аффинностью к белкам PAUF и, в частности, более высокой аффинностью по сравнению с PMAb83 (то есть существующим человеческим антителом против PAUF).

Пример 3-4. Подтверждение эпитопов

Для подтверждения эпитопа hPMAb22, полученного в Примере 3-1, сначала определяли, является ли PMAb83 (то есть существующее человеческое антитело против PAUF) и эпитоп таким же, что и в Примере 1-3.

В результате, как показано на Фиг. 12, было подтверждено, что hPMAb22 имеет эпитоп, который отличается от эпитопа PMAb83.

Пример 3-5. Подтверждение ингибирующего действия на пролиферацию раковых клеток

Для подтверждения влияния hPMAb22 (то есть гуманизированного антитела, полученного в Примере 3-1) на лечение рака определяли ингибирующее действие hPMAb22 на пролиферацию CFPAC-1 (то есть клеточную линию рака поджелудочной железы) посредством способа в соответствии с Примером 2-4.

В результате, как показано на Фиг. 13, было подтверждено, что группа, обработанная hPMAb22, имеет высокое ингибирующее действие на пролиферацию CFPAC-1 (то есть клеточную линию рака поджелудочной железы) по сравнению с группой, обработанной IgG (то есть группа контрольного антитела).

На основании этих результатов было подтверждено, что hPMAb22 демонстрирует превосходное ингибирующее действие на пролиферацию раковых клеток и, таким образом, hPMAb22 можно эффективно использовать в качестве вещества для предупреждения и лечения рака.

Пример 3-6. Подтверждение ингибирующего действия на миграцию раковых клеток

Для подтверждения влияния hPMAb22 (то есть гуманизированного антитела, полученного в Примере 3-1) на лечение рака, подтверждали ингибирующее действие hPMAb22 на миграцию AMCPAC06 (то есть клеток рака поджелудочной железы, полученных от пациента с раком поджелудочной железы) и OVCAR-5 (то есть клеток клеточной линии рака яичников) с помощью метода согласно Примеру 2-5.

В результате, как показано на Фиг. 14, группа лечения hPMAb22 показала значительное снижение уровней миграции клеток клеточной линии рака поджелудочной железы, раковых клеток, полученных от пациента с раком поджелудочной железы, и клеток клеточной линии рака яичников по сравнению с группой лечения IgG (то есть

группой контрольного антитела). В частности, эти результаты подтвердили, что уменьшение уровня миграции при лечении hPMAb22 было даже ниже, чем в группе лечения PMAb83.

На основании этих результатов было подтверждено, что hPMAb22 демонстрирует лучшее ингибирующее действие на миграцию раковых клеток по сравнению с PMAb83 (то есть с существующим человеческим антителом против PAUF) и, таким образом, hPMAb22 можно эффективно использовать в качестве вещества для предупреждения и лечения рака.

Пример 3-7. Подтверждение ингибирующего действия на инвазию раковых клеток Для подтверждения влияния hPMAb22 (то есть гуманизированного антитела, полученного в Примере 3-1) на лечение рака, подтверждали ингибирующее действие hPMAb22 на инвазию AMCPAC04 или AMCPAC06 (то есть клеток рака поджелудочной железы, полученных от пациента с раком поджелудочной железы) и OVCAR-5 (то есть клеточной линии рака яичников) при помощи метода согласно Примеру 2-6.

В результате, как показано на Фиг. 15, группа лечения hPMAb22 показала значительное снижение уровней инвазии клеточной линии рака поджелудочной железы, линии раковых клеток, полученных от пациента с раком поджелудочной железы, и линии клеток рака яичников по сравнению с группой лечения IgG (то есть группой контрольного антитела). В частности, эти результаты подтвердили, что снижение уровня инвазии при лечении hPMAb22 был даже ниже, чем в группе лечения PMAb83.

На основании этих результатов было подтверждено, что hPMAb22 демонстрирует существенное ингибирующее действие на инвазию раковых клеток по сравнению с PMAb83 (то есть существующим человеческим антителом против PAUF) и, таким образом, hPMAb22 можно эффективно использовать в качестве вещества для предупреждения и лечения рака.

Пример 3-8. Подтверждение противоракового эффекта *in vivo*

Поскольку в Примерах 3-5 - 3-7 было подтверждено, что hPMAb22, который является гуманизированным антителом, специфичным к белкам PAUF, ингибирует пролиферацию, миграцию и инвазию раковых клеток *in vitro*, проверяли, демонстрирует ли hPMAb22 также и такие же противораковые эффекты *in vivo*.

Более конкретно, раковую ткань от пациента с аденокарциномой протоков поджелудочной железы трансплантировали каждой из мышей NSG для получения модели ксенотрансплантата, полученного от пациента (PDX). Раковую ткань, извлеченную из мышечной модели PDX, подкожно трансплантировали в правую ногу каждой из "голых" мышей. Примерно через 3 недели отбирали мышей с размером опухоли от 80 до 120 мм³ и разделяли их на группы. Лекарственное средство вводили в хвостовые вены мышей. IgG и hPMAb22 вводили в дозе 10 мг/кг два раза в неделю суммарно в течение 4 недель, а Gemzar[®] (гемцитабин), который использовали в качестве положительного контроля, вводили однократно в дозе 50 мг/кг. В частности, размер опухоли измеряли с использованием штангенциркуля два раза в неделю, и массу тела каждой мыши также измеряли для определения реакции опухоли на лекарственное средство. После прекращения эксперимента на 31-е сутки опухоли извлекали и измеряли и сравнивали массу каждой опухоли.

В результате, как показано на Фиг. 16, было подтверждено, что в группе лечения hPMAb22 наблюдалось 30% или более снижение роста раковых клеток по сравнению с группой лечения антителом контрольной группы. В частности, было подтверждено, что ингибирующее действие hPMAb22 на рост опухоли было выше чем ингибирующее

действие в группе введения Gemzar[®], применяемого в качестве противоракового средства.

На основании этих результатов было подтверждено, что hPMAb22 демонстрирует более высокое ингибирующее действие на рост раковых клеток *in vivo* по сравнению с Gemzar[®] (то есть существующим противораковым средством) и, таким образом, hPMAb22 можно эффективно использовать в качестве вещества для предупреждения и лечения рака.

Исходя из вышеизложенного, специалист в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение, может понять, что настоящее изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без изменения технических концепций или существенных характеристик настоящего изобретения. В этом отношении проиллюстрированные примерами воплощения, раскрытые в данном описании изобретения, предназначены только для иллюстративных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения. Напротив, подразумевается, что настоящее изобретение охватывает не только приведенные в примерах воплощения, но также различные альтернативы, модификации, эквиваленты и другие воплощения, которые могут быть включены в пределах сущности и объема настоящего изобретения, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Dong-A University Research Foundation For Industry-Academy Cooperation
Prestige BioPharma Pte. Ltd.

<120> Antibody specifically binding to PAUF and use thereof

<130> OPA17181

<150> 10-2017-0096370

<151> 2017-07-28

<160> 39

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH-CDR1 of 2H2, 20C5 and hPMAb22

<400> 1

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH-CDR2 of 2H2 and hPMAb22

<400> 2

Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asn Thr

1 5

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VH-CDR3 of 2H2 and hPMAb22
 <400> 3
 5 Ala Arg Arg Ala Ile Thr Thr Ala Thr Ala Trp Phe Ala
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 14
 <212> PRT
 10 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VH-CDR3 из 2H2 и hPMAb22
 <400> 4
 Ala Arg Arg Ala Ile Thr Thr Ala Thr Ala Trp Phe Ala Tyr
 15 1 5 10
 <210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 20 <220>
 <223> VL-CDR1 из 2H2, 20C5 и hPMAb22
 <400> 5
 Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr
 1 5 10
 25 <210> 6
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 30 <223> VL-CDR2 из 2H2, 20C5 и hPMAb22
 <400> 6
 Trp Ala Ser
 1
 <210> 7
 35 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VL-CDR3 из 2H2 и hPMAb22
 40 <400> 7
 Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Tyr
 1 5
 <210> 8
 <211> 25
 45 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VH-FR1 из 2H2

<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
 5 20 25
 <210> 9
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 10 <220>
 <223> VH-FR2 из 2H2 и 20C5
 <400> 9
 Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10 15
 15 Trp
 <210> 10
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 20 <220>
 <223> VH-FR3 из 2H2
 <400> 10
 Ile Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr
 1 5 10 15
 25 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
 30 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VH-FR4 из 2H2
 35 <400> 11
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 11
 40 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VH-FR4 из 2H2
 <400> 12
 45 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 1 5 10
 <210> 13
 <211> 26

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VL-FR1 из 2H2
 5 <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
 10 <210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 15 <223> VL-FR2 из 2H2 и 20C5
 <400> 14
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 1 5 10 15
 Tyr
 20 <210> 15
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 25 <223> VL-FR3 из 2H2 и 20C5
 <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
 30 20 25 30
 Val Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 16
 <211> 11
 35 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VL-FR4 из 2H2
 <400> 16
 40 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 1 5 10
 <210> 17
 <211> 121
 <212> PRT
 45 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VH из 2H2
 <400> 17

RU 2 735 102 C1

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
5 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
10 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
15 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120
<210> 18
<211> 112
<212> PRT
20 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> VL из 2H2
<400> 18
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
25 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
30 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
35 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
40 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> VH-FR1 из hPMab22
<400> 19
45 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> Artificial Sequence
 5 <220>
 <223> VH-FR2 из hPMAb22
 <400> 20
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10 15
 10 Trp
 <210> 21
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 15 <220>
 <223> VH-FR3 из hPMAb22
 <400> 21
 Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr
 1 5 10 15
 20 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
 25 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VH-FR4 из hPMAb22
 30 <400> 22
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 23
 <211> 11
 35 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VH-FR4 из hPMAb22
 <400> 23
 40 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 24
 <211> 26
 <212> PRT
 45 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VL-FR1 из hPMAb22
 <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

5 <210> 25
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

10 <223> VL-FR2 из hPMAb22
<400> 25
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
1 5 10 15
Tyr

15 <210> 26
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

20 <223> VL-FR3 из hPMAb22
<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
25 20 25 30
Val Tyr Tyr Cys
35

30 <210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> VL-FR4 из hPMAb22
<400> 27

35 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10
<210> 28
<211> 121
<212> PRT

40 <213> Artificial Sequence
<220>

<223> VH из hPMAb22
<400> 28
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
45 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

RU 2 735 102 C1

		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
5		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		
10		Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
				115					120								
		<210>		29													
		<211>		112													
		<212>		PRT													
15		<213>		Artificial	Sequence												
		<220>															
		<223>		VL из	hPMAb22												
		<400>		29													
		Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
20		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			
25		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
30					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													
35		<212>		PRT													
		<213>		Artificial	Sequence												
		<220>															
		<223>		VH-CDR3 из	20C5												
		<400>		30													
40		Ala	Arg	Arg	Gly	Trp	Leu	Pro	Ala	Trp	Phe	Ala	Tyr				
		1				5					10						
		<210>		31													
		<211>		8													
		<212>		PRT													
45		<213>		Artificial	Sequence												
		<220>															
		<223>		VL-CDR3 из	20C5												
		<400>		31													

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr
 1 5
 <210> 32
 <211> 25
 5 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VH-FR1 из 20C5
 <400> 32
 10 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
 15 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VH-FR3 из 20C5
 20 <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
 25 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VH-FR4 из 20C5
 <400> 34
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 35 1 5 10
 <210> 35
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 40 <220>
 <223> VL-FR1 из 20C5
 <400> 35
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 45 Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser
 20 25
 <210> 36
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VL-FR4 нз 20C5
 5 <400> 36
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10
 <210> 37
 <211> 119
 10 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VH нз 20C5
 <400> 37
 15 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
 20 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
 25 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
 30 115
 <210> 38
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 35 <220>
 <223> VL нз 20C5
 <400> 38
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 40 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
 45 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														
5	<211>		8														
	<212>		PRT														
	<213>		Artificial Sequence														
	<220>																
	<223>		VH-CDR2 из 20C5														
10	<400>		39														
	Ile	Asp	Pro	Glu	His	Gly	Asn	Thr									
	1					5											

(57) Формула изобретения

1. Антитело, которое связывается с белком активирующего фактора аденокарциномы поджелудочной железы (PAUF), содержащее вариательную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 1; CDR2 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 2 или 39; и CDR3 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 3, 4 или 30; и вариательную область легкой цепи, которая содержит CDR1 легкой цепи с SEQ ID NO: 5; CDR2 легкой цепи с SEQ ID NO: 6 и CDR3 легкой цепи с SEQ ID NO: 7 или 31.
2. Антитело по п. 1, где вариательная область тяжелой цепи антитела содержит FR1 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 8, 19 или 32; FR2 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 9 или 20; FR3 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 10, 21 или 33 и FR4 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 11, 12, 22, 23 или 34; и вариательная область легкой цепи антитела содержит FR1 легкой цепи с SEQ ID NO: 13, 24 или 35; FR2 легкой цепи с SEQ ID NO: 14 или 25; FR3 легкой цепи с SEQ ID NO: 15 или 26 и FR4 легкой цепи с SEQ ID NO: 16, 27 или 36.
3. Антитело по п. 1, где вариательная область тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, 28 или 37 и вариательная область легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18, 29 или 38.
4. Полинуклеотид, кодирующий антитело по любому из пп. 1-3.
5. Экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид по п. 4.
6. Трансформант для продуцирования антитела, которое связывается с белком активирующего фактора аденокарциномы поджелудочной железы (PAUF), где в указанный трансформант введен экспрессионный вектор по п. 5.
7. Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения рака, содержащая антитело по любому из пп. 1-3 в эффективном количестве, где рак представляет собой рак поджелудочной железы или рак яичников.
8. Способ предупреждения или лечения рака, включающий введение субъекту антитела по любому из пп. 1-3, где рак представляет собой рак поджелудочной железы или рак яичников.
9. Способ ингибирования пролиферации, миграции или инвазии раковых клеток, включающий введение субъекту антитела по любому из пп. 1-3, где рак представляет собой рак поджелудочной железы или рак яичников.
10. Конъюгат антитело-лекарственное средство для предупреждения или лечения рака, где лекарственное средство конъюгировано с антителом по любому из пп. 1-3 и где рак представляет собой рак поджелудочной железы или рак яичников.
11. Композиция для диагностики рака, содержащая антитело по любому из пп. 1-3 в эффективном количестве, где рак представляет собой рак поджелудочной железы или

рак яичников.

12. Набор для диагностики рака, содержащий композицию по п. 11 и композицию, содержащую один или несколько видов других компонентов, раствора или устройства, подходящих для метода анализа, где рак представляет собой рак поджелудочной железы

13. Способ диагностики рака, включающий обнаружение белка активирующего фактора аденокарциномы поджелудочной железы (PAUF) в биологическом образце, выделенном от субъекта с подозрением на наличие рака, посредством реакции антиген-антитело с использованием антитела по любому из пп. 1-3, где рак представляет собой

14. Способ скрининга вещества для предупреждения или лечения рака, включающий:
(а) обработку раковых клеток веществом-кандидатом для предупреждения или лечения рака;

(б) измерение уровня белка активирующего фактора аденокарциномы поджелудочной железы (PAUF) в раковых клетках, обработанных веществом-кандидатом, с использованием антитела по любому из пп. 1-3; и

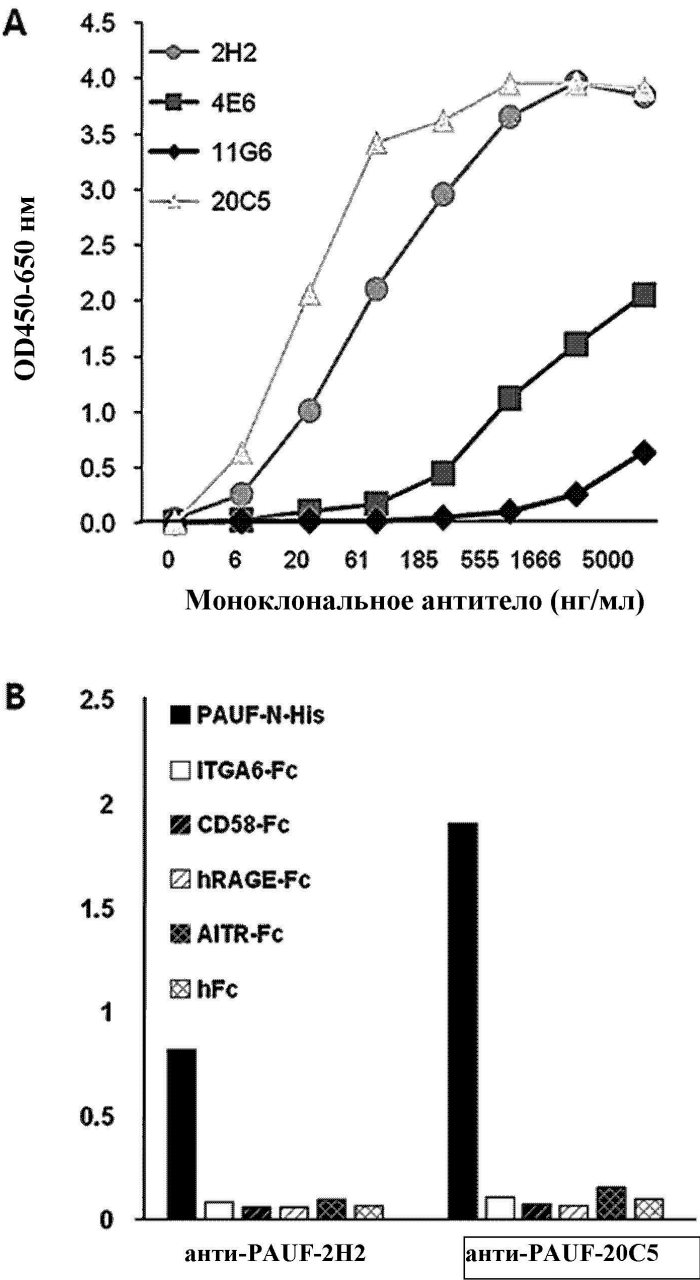
(в) определение, можно ли использовать вещество-кандидат, которым были обработаны клетки на стадии (а), в качестве вещества для предупреждения или лечения рака, когда уровень белка PAUF на стадии (б) ниже, чем в раковых клетках, не обработанных веществом-кандидатом,

где вещество-кандидат для предупреждения или лечения рака представляет собой вещество, которое, как ожидается, способно лечить рак;

и где рак представляет собой рак поджелудочной железы или рак яичников.

1

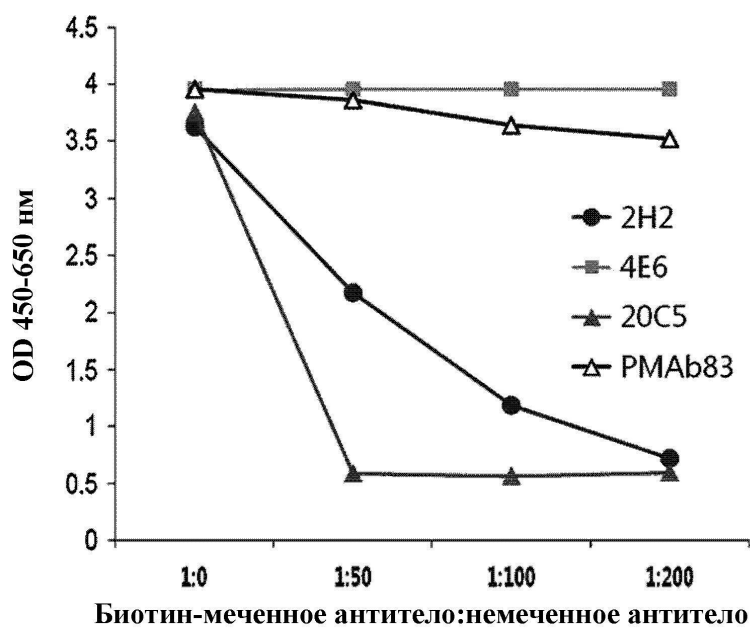
Фиг. 1 1/12



2

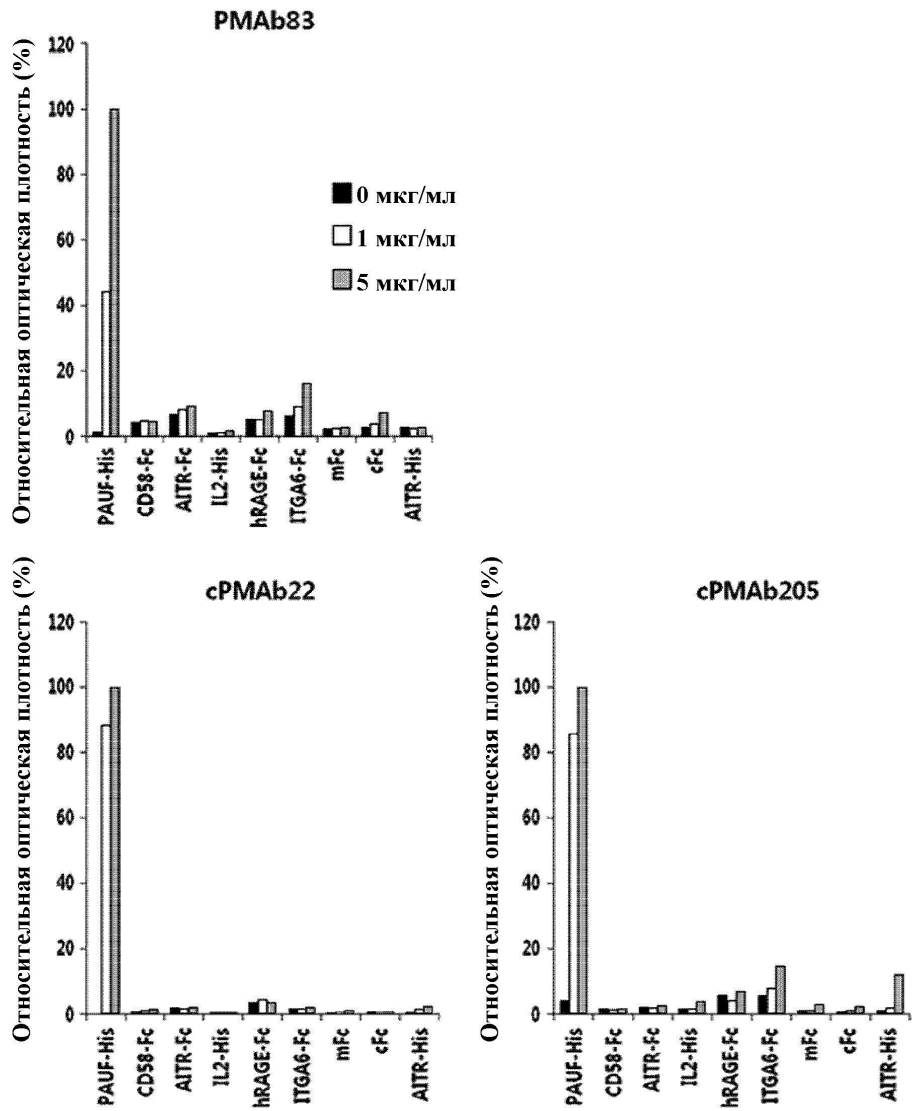
2/12

Фиг. 2

Конкурентный ELISA с биотин-меченым 2H2

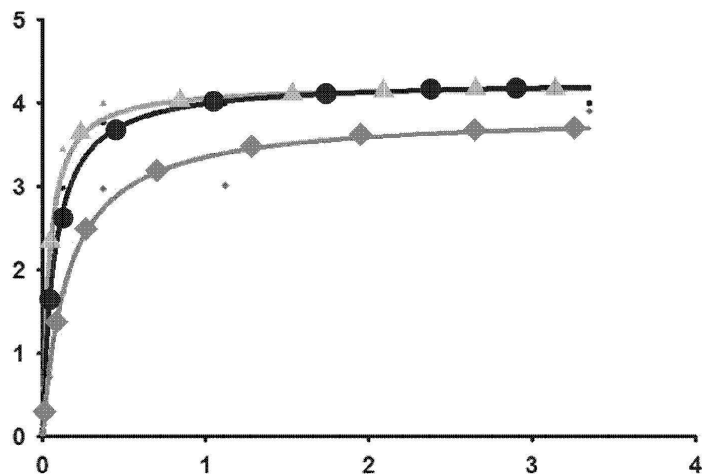
Фиг. 3

3/12



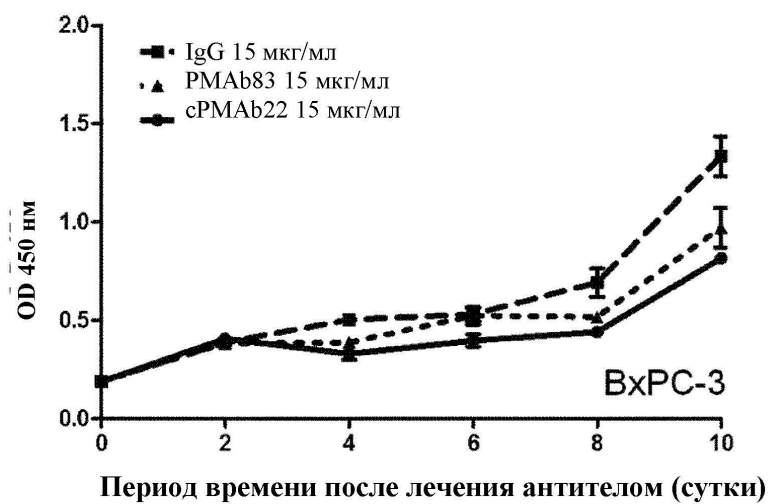
Фиг. 4

4/12



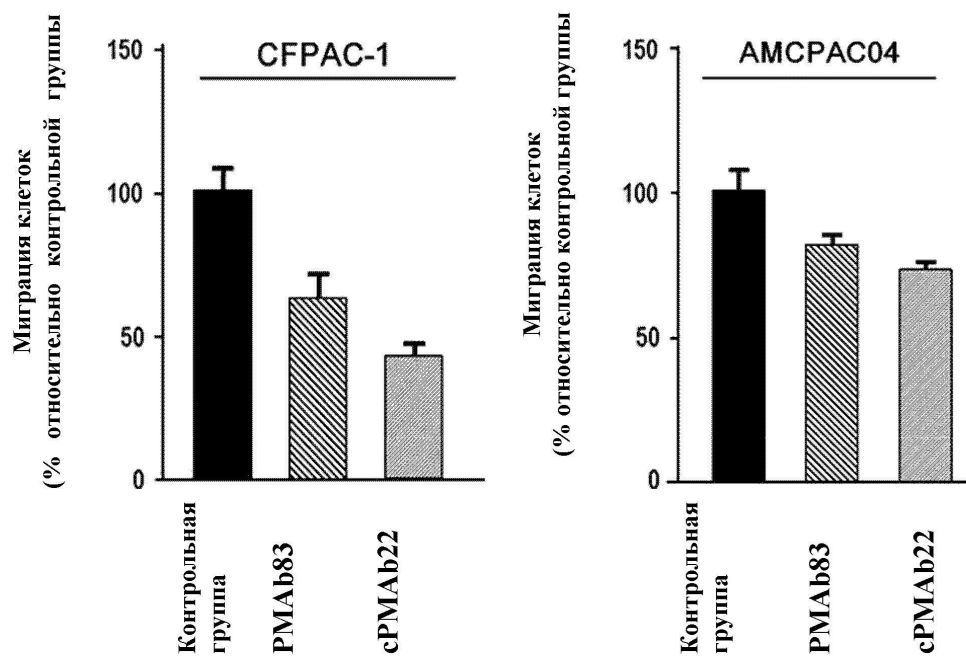
обозначение	антитело	K_d (10^{-9} М)
	cPMAb22	0.01
	cPMAb205	0.03
	PMAb83	0.18

Фиг. 5

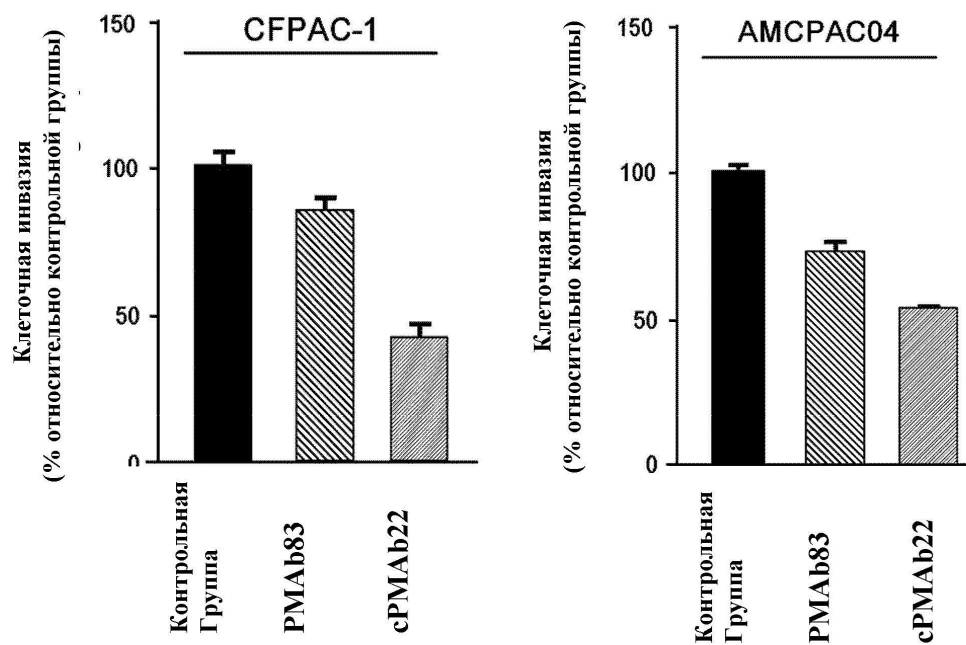


5/12

Фиг. 6

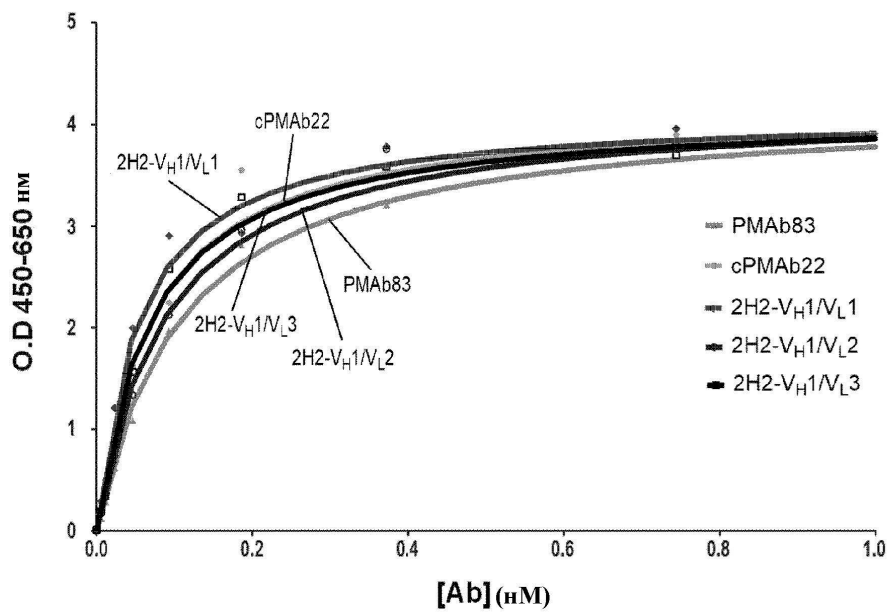


Фиг. 7

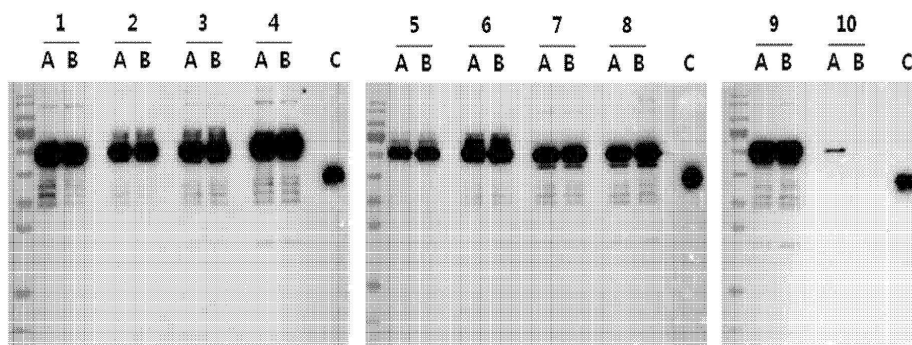


Фиг. 8

6/12



Фиг. 9



► **ВЫХОД**

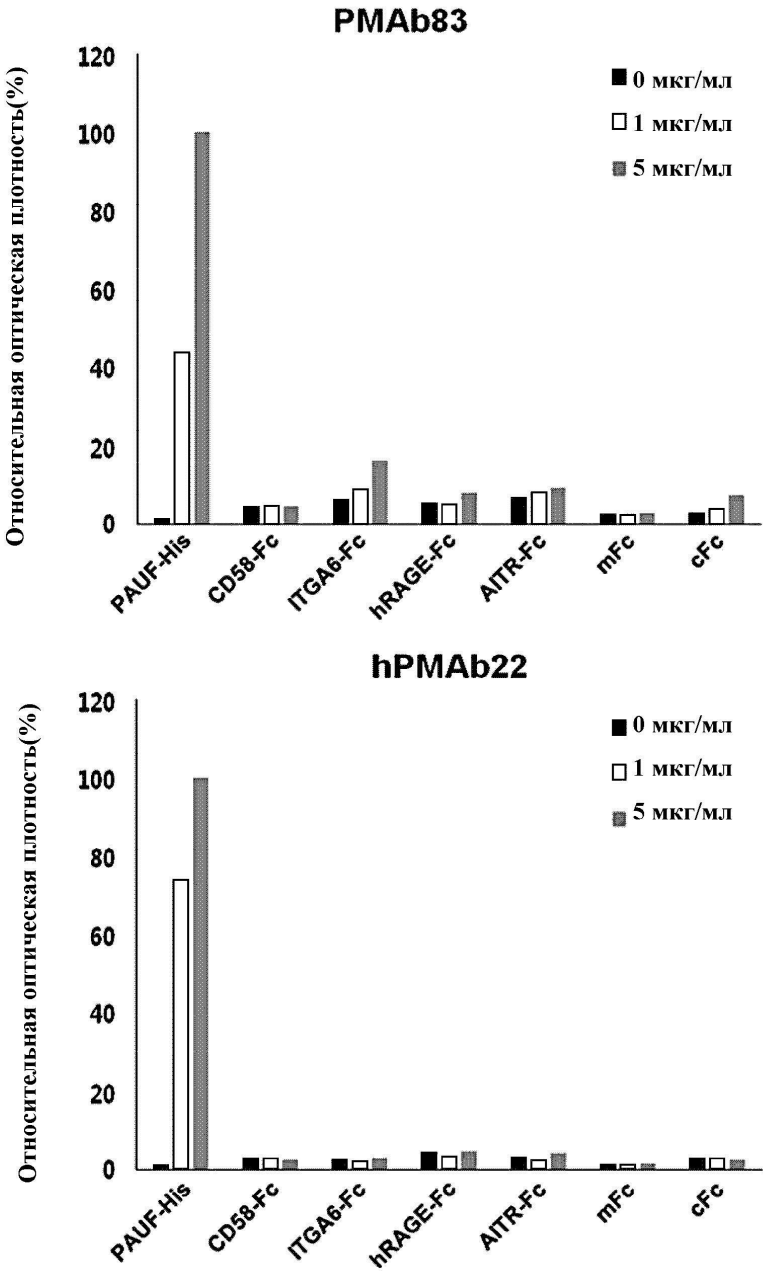
1 : 2H2-V_H1-V_L1 : 165,5 мг/л

2 : 2H2-V_H1-V_L2 : 28,25 мг/л

3 : 2H2-V_H1-V_L3 : 42,0 мг/л

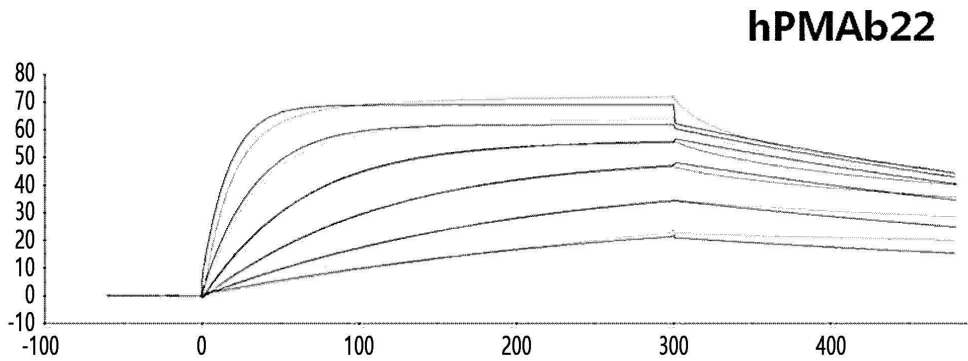
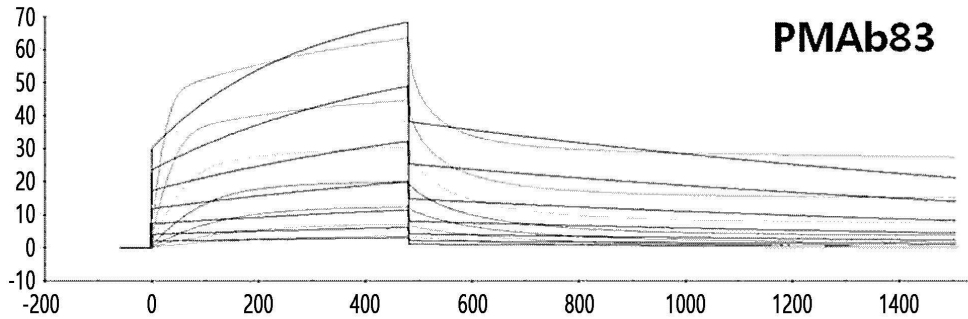
Фиг. 10

7/12



Фиг. 11

8/12

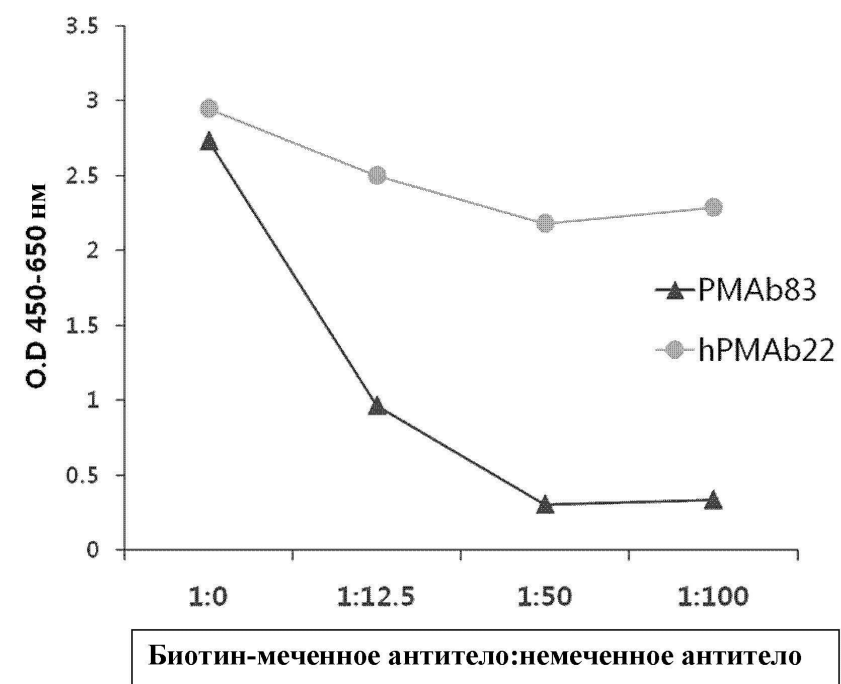


Антитело	$K_d (10^{-9} \text{ M})$
PMAb83	1.169
hPMAb22	0.1938

Фиг. 12

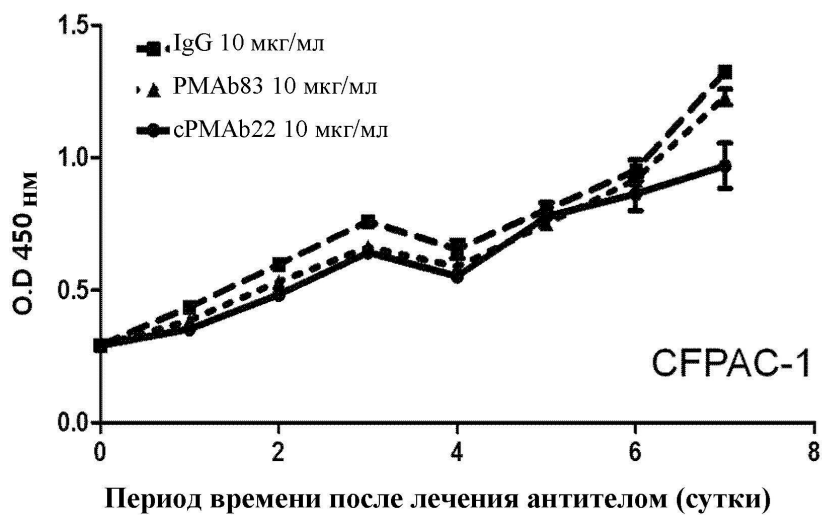
9/12

Конкурентный ELISA с биотин-меченым PMAb83

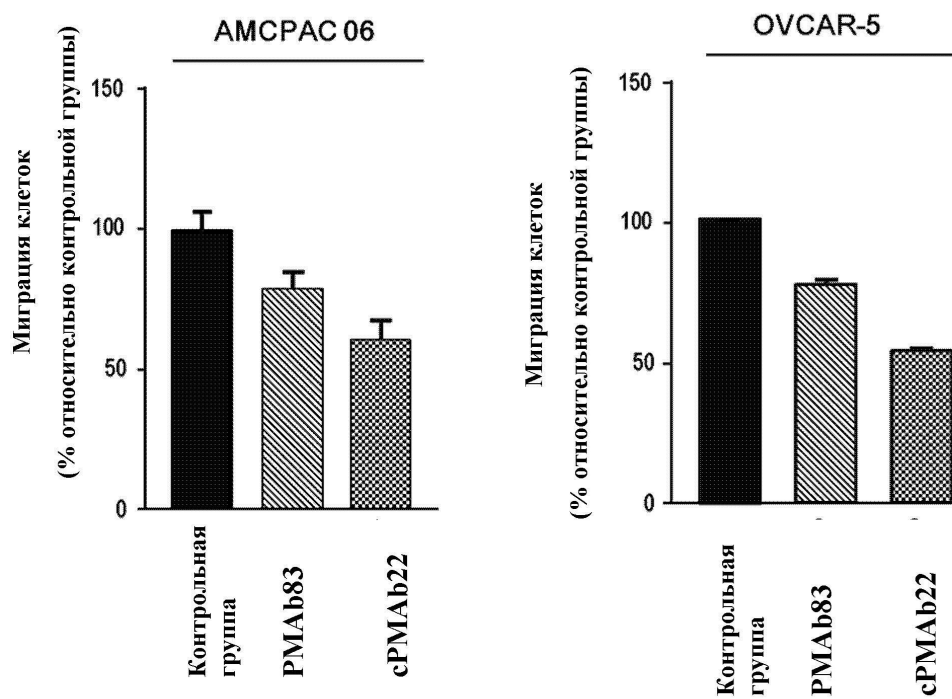


Фиг. 13

10/12

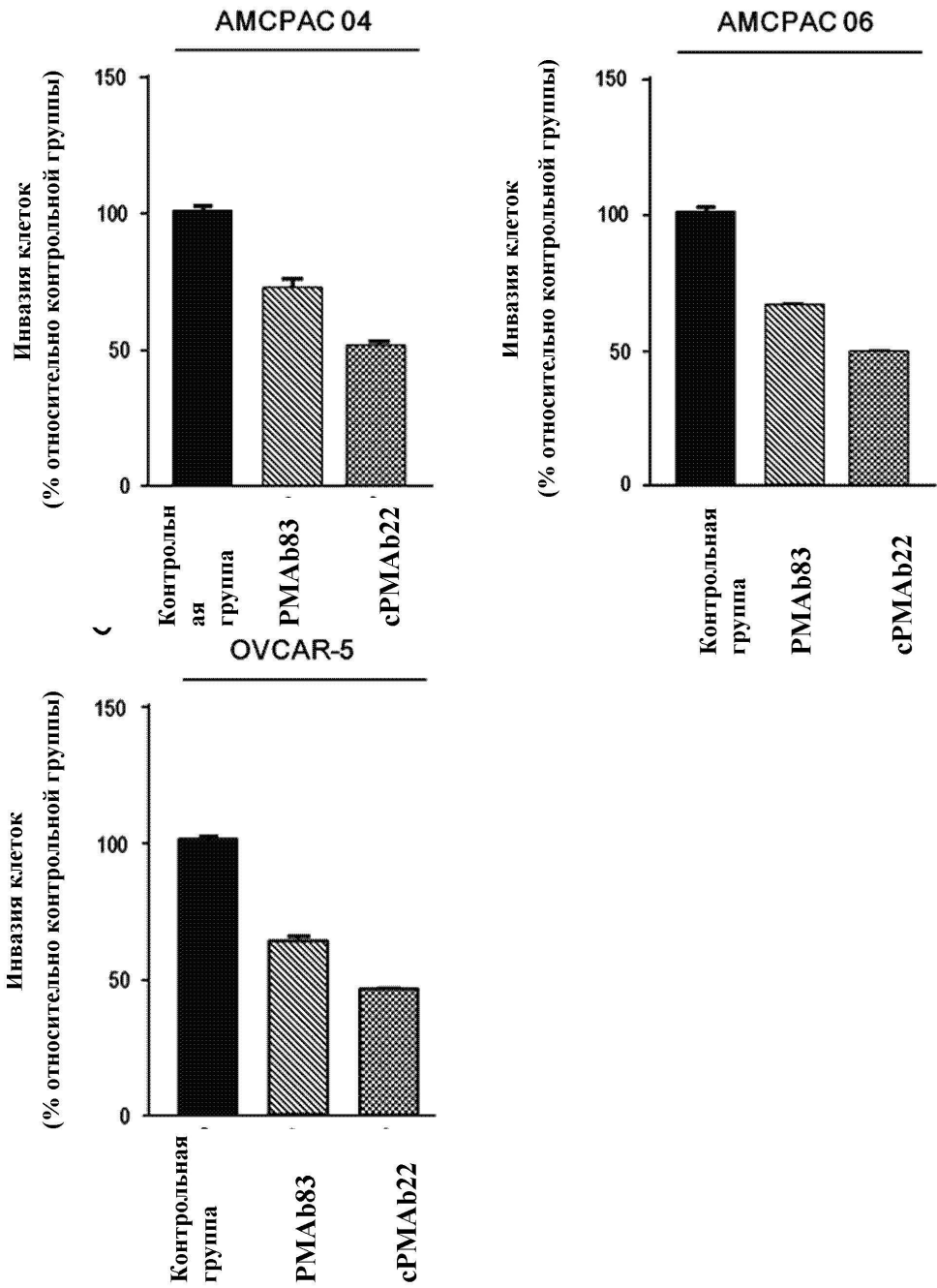


Фиг. 14



Фиг. 15

11/12



Фиг. 16

12/12

