

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6339063号
(P6339063)

(45) 発行日 平成30年6月6日(2018.6.6)

(24) 登録日 平成30年5月18日(2018.5.18)

(51) Int.Cl.		F I	
C07K	16/24	(2006.01)	C O 7 K 16/24
A61K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 D
A61P	1/04	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
A61P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P 1/04
A61P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P 1/16

請求項の数 9 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-500366 (P2015-500366)	(73) 特許権者	513061541 エスエヌユー アールアンドディービー ファウンデーション 大韓民国 151-015 ソウル クア ナクーグ クアナクーロ (シルリムード ン) 1
(86) (22) 出願日	平成25年3月15日(2013.3.15)	(73) 特許権者	507326766 キム、ヒュンケ 大韓民国、ソウル 135-110、ガン ナムグ、アプグジョンードン、434、 ヒュンダイ・アパートメント 118-8 04
(65) 公表番号	特表2015-512894 (P2015-512894A)	(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
(43) 公表日	平成27年4月30日(2015.4.30)		
(86) 国際出願番号	PCT/KR2013/002119		
(87) 国際公開番号	W02013/137686		
(87) 国際公開日	平成25年9月19日(2013.9.19)		
審査請求日	平成26年11月11日(2014.11.11)		
審判番号	不服2017-198 (P2017-198/J1)		
審判請求日	平成29年1月6日(2017.1.6)		
(31) 優先権主張番号	61/611, 285		
(32) 優先日	平成24年3月15日(2012.3.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グレムリン-1 に対する抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

グレムリン - 1 に対する抗体であって、該抗体は、軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含み、前記軽鎖可変領域は、配列番号 7 のアミノ酸配列を有し、かつ、前記重鎖可変領域は、配列番号 8 のアミノ酸配列を有し、かつ、

骨形成タンパク質 (BMP) および血管内皮成長因子受容体 - 2 (VEGFR2) に非依存的な方式によりグレムリン - 1 を抑制することにより、癌に対して治療効果を有することを特徴とする、前記抗体。

【請求項 2】

軽鎖不変領域及び重鎖不変領域をさらに含む、請求項 1 に記載のグレムリン - 1 に対する抗体。

【請求項 3】

前記抗体の軽鎖不変領域及び重鎖不変領域が、ヒトまたはウサギのものであることを特徴とする請求項 2 に記載のグレムリン - 1 に対する抗体。

【請求項 4】

前記抗体が、グレムリン - 1 が癌細胞に直接的に結合することを抑制することを特徴とする請求項 1 に記載のグレムリン - 1 に対する抗体。

【請求項 5】

前記抗体が、グレムリン - 1 に依存する細胞移動性 (cell migration)、細胞浸潤性 (cell invasion) 及び細胞増殖 (cell proliferat

10

20

ion)を抑制することを特徴とする請求項1に記載の抗体。

【請求項6】

請求項1～5のいずれか1項に記載の抗体及び薬学的に許容可能な担体を含む癌の予防または治療用薬学的組成物。

【請求項7】

前記癌が、前立腺癌、膵臓癌、肺癌、非小細胞肺癌、胃癌、肝癌、腎臓癌、卵巣癌、大腸癌、直腸癌、乳房癌、甲状腺癌、皮膚癌、骨癌、基底細胞癌、扁平細胞癌、鼻咽頭癌、膀胱癌、子宮癌、皮膚癌、食道癌及び頭頸部癌よりなる群から選ばれることを特徴とする請求項6に記載の薬学的組成物。

【請求項8】

請求項1～5のいずれか1項に記載の抗体を含む癌診断用キット。

【請求項9】

前記癌が、前立腺癌、膵臓癌、肺癌、非小細胞肺癌、胃癌、肝癌、腎臓癌、卵巣癌、大腸癌、直腸癌、乳房癌、甲状腺癌、皮膚癌、骨癌、基底細胞癌、扁平細胞癌、鼻咽頭癌、膀胱癌、子宮癌、皮膚癌、食道癌及び頭頸部癌よりなる群から選ばれることを特徴とする請求項8に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、グレムリン-1(gremlin-1)に対する抗体に係り、さらに詳しくは、骨形成タンパク質(Bone Morphogenetic Protein; BMP)または血管内皮成長因子受容体-2(VEGFR2)に非依存的な方式によりグレムリン-1を抑制することにより、癌に対して治療効果を有するグレムリン-1に対する抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

グレムリン-1(gremlin-1, 20.7kDa)は、骨形成タンパク質(BMP)の拮抗剤であり、システインリッチな領域、システインノットモチーフ(cysteine knot motif)及びTGF-スーパーファミリの構成員と共通する構造を有する184個のアミノ酸よりなるタンパク質である。前記タンパク質は進化的に保存されており、ヒトグレムリン遺伝子(GREM1)は染色体15q13-q15の上に位置する(Topol LZ et al., (1997) Mol. Cell Biol., 17: 4801-4810; Topol LZ et al., Cytogenet Cell Genet., 89: 79-84)。グレムリン-1は分泌タンパク質であり、3種類のアイソフォーム(isoform)が報告されている(Topol LZ et al., J. Biol. Chem., 275: 8785-8793)。アイソフォーム1は最も頻繁に見られるアイソフォームであり、アイソフォーム2及び3はそれぞれアミノ酸39-79及び10-79が欠失している。

【0003】

グレムリン-1は、BMP-2、BMP-4及びBMP-7とヘテロダイマー(heterodimer)を形成することにより、骨形成タンパク質(BMP)が細胞表面上の受容体に結合することを抑制する(Stanley E et al., (1998) Mech. Dev., 77: 173-184; Merino R et al., (1999) Development, 126: 5515-5522; Lappin DW et al., (2000) Curr. Opin. Nephrol. Hypertens., 9: 469-472)。また、グレムリン-1は、肺、腕脚及び腎臓発達過程だけではなく、神経堤細胞(neutral crest cell)の分化過程においてBMPを調節する重要な役割を果たす(Lu MM et al., (2001) Dev. Dyn., 222: 667-680; Shi W et al., (2001) Am. J. Physiol. Lung

10

20

30

40

50

Cell Mol. Physiol., 280: L1030-1039)。グレムリン-1は可溶性リガンドに対して拮抗効果を示すだけでなく、細胞内においてBMP-4前駆タンパク質と相互作用して胚芽肺においてBMP-4媒介信号伝達活性を下向き調節する(Sun J et al., (2006) J. Biol. Chem., 281: 29349-29356)。さらに、グレムリン-1は分泌された軸索ガイダンスタンパク質(axonal guidance protein)の一つであるスリットタンパク質(Slit protein)と相互作用し、単核球走化性(chemotaxis)の抑制剤として働く(Chen B et al., (2004) J. Immunol., 173: 5914-5917)。最近には、グレムリン-1が骨形成タンパク質(BMP)に非依存的な方式により血管内皮成長因子受容体-2(VEGFR2)に結合して血管形成を調節するということが報告されている(Mitola S et al., (2010) Blood, 116: 3677-3680)。グレムリン-1は、子宮頸管、子宮内膜、肺、卵巣、腎臓、乳房、大腸及び膵臓の癌腫をはじめとする様々なヒト腫瘍において過発現されるが(Namkoong H et al., (2006) BMC Cancer, 6: 74; Sha G et al., (2009) Fertil Steril., 91: 350-358)、腫瘍形成におけるその役割は詳細に研究されていない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明者らは、グレムリン-1の腫瘍関連の特性について鋭意検討したところ、グレムリン-1が骨形成タンパク質(BMP)や血管内皮成長因子受容体-2(VEGFR2)とは無関係に癌細胞と直接的に相互作用をするということを見出し、これに基づいてグレムリン-1を抑制する抗体を開発するに至った。

【課題を解決するための手段】

【0005】

発明の要約

本発明は、骨形成タンパク質(BMP)または血管内皮成長因子受容体-2(VEGFR2)に非依存的な方式によりグレムリン-1を抑制することにより、癌または免疫疾患に対して治療効果を有するグレムリン-1に対する抗体を提供する。

また、本発明は、前記抗体及び薬学的に許容可能な添加剤を含む癌または免疫疾患の予防または治療用薬学的組成物を提供する。

さらに、本発明は、前記抗体またはこれを含む薬学的組成物をこれを必要とする対象に投与することを含む癌または免疫疾患の治療方法を提供する。

さらにまた、本発明は、前記抗体を含む癌または免疫疾患の診断用キットを提供する。

【発明の効果】

【0006】

本発明によるグレムリン-1に対する抗体は、グレムリン-1が骨形成タンパク質(BMP)または血管内皮成長因子受容体-2(VEGFR2)に非依存的な方式により癌細胞に結合することを抑制するので、グレムリン-1によって媒介される各種の癌または免疫疾患の予防または治療に効果的に使用される。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】図1は、2次抗体、グレムリン-1単独及びグレムリン-1と本発明による抗体または対照群抗体との組み合わせを4種の癌細胞(A549、HeLa、A172及びA431)と反応させた後、フローサイトメトリーにより測定したグラフである。

【図2】図2Aは、グレムリン-1をヒト臍帯静脈内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells; HUVEC)細胞と反応させた後、フローサイトメトリーにより測定したグラフである。図2Bは、グレムリン-1をHUVEC、A549及びHeLa細胞と反応させた後、VEGFR2 mRNA及びタ

10

20

30

40

50

ンパク質発現を逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; RT-PCR) 法により測定した結果である。図 2 C は、グレムリン - 1 を HUVEC、A549 及び HeLa 細胞と反応させた後、VEGFR2 mRNA 及びタンパク質発現を免疫プロット分析により測定した結果である。

【図 3】図 3 A は、BMP - 2、BMP - 4 及び BMP - 7 に グレムリン - 1 単独、本発明による抗体単独及びこれらの組み合わせを反応させて BMP に結合された グレムリン - 1 の量を酵素免疫分析により測定した結果である。図 3 B は、A549 細胞と グレムリン - 1 を反応させ、ここに 10 倍モル過量の BMP - 2、BMP - 4 及び BMP - 7 を加えた後、フローサイトメトリーにより測定したグラフである。

【図 4】図 4 A は、A549 細胞を グレムリン - 1 と反応させた後、クリスタルバイオレットで染色して撮影した細胞のイメージである。図 4 B は、A549 細胞を グレムリン - 1 と反応させた後、E-カドヘリン (E-cadherin) の発現を免疫プロット分析により測定したものである。図 4 C は、A549 細胞を グレムリン - 1 と反応させた後、E-カドヘリン (E-cadherin) の発現を免疫蛍光染色により測定したものである。図 4 D は、A549 細胞を グレムリン - 1 単独及び グレムリン - 1 と本発明による抗体または対照群抗体との組み合わせと反応させた後、細胞の移動を測定したグラフである。

【図 5】図 5 A は、グレムリン - 1 - A549 細胞株、mock-A549 細胞株における グレムリン - 1 mRNA 及びタンパク質発現を RT-PCR 及びウェスタンブロット 20 によって測定したものである。図 5 B は、グレムリン - 1 - A549 細胞株、mock-A549 細胞株及び本発明による抗体及び対照群抗体を処理した グレムリン - 1 - A549 細胞株における E-カドヘリンの発現量を免疫プロット分析方法により測定したものである。図 5 C は、mock-A549 細胞株及び グレムリン - 1 - A549 細胞株において浸潤された細胞の数を測定したグラフである。図 5 D は、グレムリン - 1 - A549 細胞株、mock-A549 細胞株及び本発明による抗体及び対照群抗体を処理した グレムリン - 1 - A549 細胞株における細胞移動を測定したグラフである。図 5 E は、グレムリン - 1 - A549 細胞株、mock-A549 細胞株及び本発明による抗体を処理した グレムリン - 1 - A549 細胞株の細胞成長を測定したグラフである。図 5 F は、グレムリン - 1 - A549 細胞株及び mock-A549 細胞株をヌードマウスに注射した後、30 形成された腫瘍体積を測定したグラフである。

【図 6 A】免疫組織化学染色法を用いて正常組織及び癌組織 (皮膚、乳房) を本発明による抗体 (O-13) と反応させて グレムリン - 1 の発現量を比較した結果である。

【図 6 B】免疫組織化学染色法を用いて正常組織及び癌組織 (リンパ節、肺) を本発明による抗体 (O-13) と反応させて グレムリン - 1 の発現量を比較した結果である。

【図 6 C】免疫組織化学染色法を用いて正常組織及び癌組織 (肝、食道) を本発明による抗体 (O-13) と反応させて グレムリン - 1 の発現量を比較した結果である。

【図 6 D】免疫組織化学染色法を用いて正常組織及び癌組織 (胃) を本発明による抗体 (O-13) と反応させて グレムリン - 1 の発現量を比較した結果である。

【図 6 E】免疫組織化学染色法を用いて正常組織及び癌組織 (結腸、直腸) を本発明による抗体 (O-13) と反応させて グレムリン - 1 の発現量を比較した結果である。

【図 6 F】免疫組織化学染色法を用いて正常組織及び癌組織 (腎臓、膀胱) を本発明による抗体 (O-13) と反応させて グレムリン - 1 の発現量を比較した結果である。

【図 6 G】免疫組織化学染色法を用いて正常組織及び癌組織 (前立腺、睪丸) を本発明による抗体 (O-13) と反応させて グレムリン - 1 の発現量を比較した結果である。

【図 6 H】免疫組織化学染色法を用いて正常組織及び癌組織 (子宮頸、子宮内膜) を本発明による抗体 (O-13) と反応させて グレムリン - 1 の発現量を比較した結果である。

【図 6 I】免疫組織化学染色法を用いて正常組織及び癌組織 (甲状腺癌組織) を本発明による抗体 (O-13) と反応させて グレムリン - 1 の発現量を比較した結果である。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 8 】

発明を実施するための最良の態様

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明は、グレムリン - 1 に対する抗体を提供する。前記抗体は、骨形成タンパク質 (B M P) または血管内皮成長因子受容体 - 2 (V E G F R 2) に非依存的な方式によりグレムリン - 1 を抑制することにより、癌に対して治療効果を有することを特徴とする。前記抗体は、免疫抗体、キメラ抗体、ヒト抗体またはヒト化抗体であってもよいが、これらに制限されない。

【 0 0 0 9 】

前記グレムリン - 1 に対する抗体は、例えば、ファージ - ディスプレイ技術を応用して選別することができる。すなわち、フィラメント (f i l a m e n t) 状のファージ表皮タンパク質を発現する遺伝子に目的とする抗体を発現する遺伝子を融合させ、前記融合された抗体がバクテリオファージ粒子の表面に露出された抗体 - ファージ状のウィルス粒子を生成した後、バイオパニング (b i o p a n n i n g) 技法を応用してファージライブラリーから所望の抗体を選別することができる。上述したファージ - ディスプレイ技術を用いて多数の優れた効果を有する抗体を確保することができ、これらの中でも非常に優れた効果を有する 7 種の抗体を得た。

【 0 0 1 0 】

前記抗体は、軽鎖不変領域、重鎖不変領域、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含み、前記軽鎖可変領域と重鎖可変領域がそれぞれ下記のアミノ酸配列を有する抗体であってもよい：

- (1) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号 2 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体；
- (2) 配列番号 3 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号 4 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体；
- (3) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体；
- (4) 配列番号 7 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号 8 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体；
- (5) 配列番号 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体；
- (6) 配列番号 1 1 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体；及び
- (7) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体。

【 0 0 1 1 】

本発明において、前記 (1) ~ (7) の抗体をそれぞれ R - 8 0、R - 8 8、O - 1、O - 1 3、O - 2 6、J - 1 及び O - 1 3 (ヒト化) 抗体と命名した。

前記抗体の軽鎖可変領域及び重鎖可変領域は、ヒトまたはウサギのものであってもよい。前記抗体の軽鎖可変領域及び重鎖可変領域はそれぞれ単独で用いられてもよく、両方が組み合わせられて用いられてもよく、この技術分野における公知の軽鎖不変領域及び重鎖不変領域とそれぞれ組み合わせられて用いられてもよく、これらの断片が用いられてもよい。なお、前記軽鎖可変領域及び重鎖可変領域は公知の方法により s c f v (s i n g l e - c h a i n v a r i a b l e f r a g m e n t) の形に製造されてもよい。

【 0 0 1 2 】

前記配列番号 1 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域の場合、1 ~ 2 2 番目のアミノ酸はフレームワーク領域 (F R 1) であり、2 3 ~ 3 3 番目のアミノ酸は相補性決定領域 1 (C D R 1) であり、3 4 ~ 4 8 番目のアミノ酸は F R 2 であり、4 9 ~ 5 5 番目のアミノ酸は C D R 2 であり、5 6 ~ 8 7 番目のアミノ酸は F R 3 であり、8 8 ~ 1 0 0 番目のアミノ酸は C D R 3 であり、1 0 1 ~ 1 1 0 番目のアミノ酸は F R 4 である。

【 0 0 1 3 】

また、配列番号2のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域の場合、1～24番目のアミノ酸はFR1であり、25～34番目のアミノ酸はCDR1であり、35～48番目のアミノ酸はFR2であり、49～64番目のアミノ酸はCDR2であり、65～95番目のアミノ酸はFR3であり、96～105番目のアミノ酸はCDR3であり、106～116番目のアミノ酸はFR4である。

【 0 0 1 4 】

さらに、配列番号3のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域の場合、1～22番目のアミノ酸はFR1であり、23～33番目のアミノ酸はCDR1であり、34～48番目のアミノ酸はFR2であり、49～55番目のアミノ酸はCDR2であり、56～87番目のアミノ酸はFR3であり、88～100番目のアミノ酸はCDR3であり、101～110番目のアミノ酸はFR4である。

10

【 0 0 1 5 】

さらに、配列番号4のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域の場合、1～24番目のアミノ酸はFR1であり、25～34番目のアミノ酸はCDR1であり、35～48番目のアミノ酸はFR2であり、49～64番目のアミノ酸はCDR2であり、65～95番目のアミノ酸はFR3であり、96～109番目のアミノ酸はCDR3であり、110～120番目のアミノ酸はFR4である。

【 0 0 1 6 】

さらに、配列番号5のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域の場合、1～22番目のアミノ酸はFR1であり、23～35番目のアミノ酸はCDR1であり、36～50番目のアミノ酸はFR2であり、51～57番目のアミノ酸はCDR2であり、58～89番目のアミノ酸はFR3であり、90～100番目のアミノ酸はCDR3であり、101～110番目のアミノ酸はFR4である。

20

【 0 0 1 7 】

さらに、配列番号6のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域の場合、1～25番目のアミノ酸はFR1であり、26～35番目のアミノ酸はCDR1であり、36～49番目のアミノ酸はFR2であり、50～66番目のアミノ酸はCDR2であり、67～98番目のアミノ酸はFR3であり、99～110番目のアミノ酸はCDR3であり、111～122番目のアミノ酸はFR4である。

30

【 0 0 1 8 】

さらに、配列番号7のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域の場合、1～22番目のアミノ酸はFR1であり、23～35番目のアミノ酸はCDR1であり、36～50番目のアミノ酸はFR2であり、51～57番目のアミノ酸はCDR2であり、58～89番目のアミノ酸はFR3であり、90～100番目のアミノ酸はCDR3であり、101～110番目のアミノ酸はFR4である。

【 0 0 1 9 】

さらに、配列番号8のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域の場合、1～25番目のアミノ酸はFR1であり、26～35番目のアミノ酸はCDR1であり、36～49番目のアミノ酸はFR2であり、50～66番目のアミノ酸はCDR2であり、67～98番目のアミノ酸はFR3であり、99～110番目のアミノ酸はCDR3であり、111～121番目のアミノ酸はFR4である。

40

【 0 0 2 0 】

さらに、配列番号9のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域の場合、1～22番目のアミノ酸はFR1であり、23～35番目のアミノ酸はCDR1であり、36～50番目のアミノ酸はFR2であり、51～57番目のアミノ酸はCDR2であり、58～89番目のアミノ酸はFR3であり、90～100番目のアミノ酸はCDR3であり、101～110番目のアミノ酸はFR4である。

【 0 0 2 1 】

さらに、配列番号10のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域の場合、1～25番目のア

50

ミノ酸はFR1であり、26～35番目のアミノ酸はCDR1であり、36～49番目のアミノ酸はFR2であり、50～66番目のアミノ酸はCDR2であり、67～98番目のアミノ酸はFR3であり、99～110番目のアミノ酸はCDR3であり、111～121番目のアミノ酸はFR4である。

【0022】

さらに、配列番号11のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域の場合、1～23番目のアミノ酸はFR1であり、24～34番目のアミノ酸はCDR1であり、35～49番目のアミノ酸はFR2であり、50～56番目のアミノ酸はCDR2であり、57～88番目のアミノ酸はFR3であり、89～97番目のアミノ酸はCDR3であり、98～107番目のアミノ酸はFR4である。

10

【0023】

さらに、配列番号12のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域の場合、1～30番目のアミノ酸はFR1であり、31～35番目のアミノ酸はCDR1であり、36～49番目のアミノ酸はFR2であり、50～66番目のアミノ酸はCDR2であり、67～98番目のアミノ酸はFR3であり、99～110番目のアミノ酸はCDR3であり、111～121番目のアミノ酸はFR4である。

【0024】

さらに、配列番号13のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域の場合、1～23番目のアミノ酸はFR1であり、24～36番目のアミノ酸はCDR1であり、37～51番目のアミノ酸はFR2であり、52～58番目のアミノ酸はCDR2であり、59～90番目のアミノ酸はFR3であり、91～101番目のアミノ酸はCDR3であり、102～111番目のアミノ酸はFR4である。

20

【0025】

さらに、配列番号14のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域の場合、1～25番目のアミノ酸はFR1であり、26～35番目のアミノ酸はCDR1であり、36～49番目のアミノ酸はFR2であり、50～66番目のアミノ酸はCDR2であり、67～98番目のアミノ酸はFR3であり、99～110番目のアミノ酸はCDR3であり、111～121番目のアミノ酸はFR4である。

【0026】

前記配列番号1のアミノ酸配列は配列番号15の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号2のアミノ酸配列は配列番号16の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号3のアミノ酸配列は配列番号17の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号4のアミノ酸配列は配列番号18の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号5のアミノ酸配列は配列番号19の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号6のアミノ酸配列は配列番号20の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号7のアミノ酸配列は配列番号21の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号8のアミノ酸配列は配列番号22の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号9のアミノ酸配列は配列番号23の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号10のアミノ酸配列は配列番号24の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号11のアミノ酸配列は配列番号25の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号12のアミノ酸配列は配列番号26の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号13のアミノ酸配列は配列番号27の塩基配列によってコードされてもよく、配列番号14のアミノ酸配列は配列番号28の塩基配列によってコードされてもよい。

30

40

【0027】

従来よりグレムリン-1が癌組織において発現されるということが知られているが、その具体的な役割は未だ究明されていない。グレムリン-1は、骨形成タンパク質(BMP)拮抗剤として知られているだけでなく、グレムリン-1が血管内皮成長因子受容体-2(VEGFR2)に結合して血管形成を調節することが報告されているため、グレムリン-1がBMPやVEGFR2を通じて癌と関連していることが予想された。しかしながら、驚くべきことに、本発明は、グレムリン-1がBMPやVEGFR2に非依存的に、

50

すなわち、これらによって媒介されることなく、癌細胞と直接的に結合して細胞移動、浸潤及び増殖を誘導するという事を見出した。なお、グレムリン - 1 は、E - カドヘリン (E - c a d h e r i n) の発現を抑制することにより、癌細胞の成長を誘導する。

【 0 0 2 8 】

前記細胞移動、浸潤及び増殖などは上述したグレムリン - 1 に対する抗体によって抑制される。このため、グレムリン - 1 抗体は、BMP や VEGFR2 に非依存的にグレムリン - 1 を抑制することにより、すなわち、グレムリン - 1 が癌細胞に直接的に結合することを抑制することにより、癌に対する治療効果を有する。

【 0 0 2 9 】

そこで、本発明は、前記抗体及び薬学的に許容可能な添加剤を含む癌予防または治療用薬学的組成物を提供する。前記添加剤は、担体、賦形剤またはその他の添加剤であってもよい。本発明による組成物は、通常的な方法にて薬学的剤形を製造することができる。剤形を製造するに当たり、前記抗体を担体と一緒に混合または希釈するか、あるいは容器形の担体内に封入させることが好ましい。希釈剤として用いられる担体としては、抗体に対する担体、賦形剤またはミディアム (medium) として作用する固形、半固形または液状の物質が挙げられる。このため、剤形は、錠剤、丸剤、粉剤、サシェ (sachet)、エリキシル剤 (elixir)、懸濁剤、乳剤、溶液剤、シロップ剤、エアゾール剤、軟質または硬質ゼラチンカプセル剤、滅菌注射剤、滅菌粉剤などの形が挙げられる。適合な担体、賦形剤及び希釈剤の例としては、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、ケイ酸カルシウム、セルロース、メチルセルロース、微晶質セルロース、ポリピニールピロリドン、水、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、ステアリン酸マグネシウム及び及び鉱油が挙げられる。剤形は、充填剤、抗凝集剤、潤滑剤、湿潤剤、香料、乳化剤、防腐剤などをさらに含むことができる。本発明による組成物は、哺乳動物に投与された後に抗体の迅速、持続または遅延放出を与えるように当業界の公知の方法を用いて剤形化することができる。本発明による抗体組成物は、前記抗体と共にインターフェロン、抗-HBV単クローン抗体、抗-HBVポリクローナル抗体、ヌクレオチド類似体、DNAポリメラーゼ阻害剤、siRNA製剤または治療ワクチンを抗ウイルス剤としてさらに含むことができる。

【 0 0 3 0 】

本発明による抗体またはこれを含む薬学的組成物をこれを必要とする対象、例えば、ヒトをはじめとする哺乳動物に投与することにより、癌を治療することができる。このとき、前記抗体の投与量は、処理される対象、疾病または病態の重症度、投与の速度及び処方医師の判断による。有効成分として、前記抗体は、哺乳動物に対して一日につき 0.001 ~ 10 mg / kg (体重)、好ましくは、0.005 ~ 1 mg / kg (体重) の量で一日につき 1 回または 1 日につき複数回に分けて非経口的に投与することができる。場合に応じて、上述した範囲よりも少ない投与量の方がより好ましく、有害な副作用を引き起こさないつつもより多い投与量が使用されてもよく、より多い投与量の場合には一日につき複数回に分けて少量ずつ投与してもよい。

【 0 0 3 1 】

このため、本発明は、本発明による抗体または前記薬学的組成物をこれを必要とする対象に投与することを含む癌の治療方法を提供する。前記本発明による抗体は、骨形成タンパク質 (BMP) または血管内皮成長因子受容体 - 2 (VEGFR2) に非依存的な方式によりグレムリン - 1 を抑制することにより、癌を治療することを特徴とする。

【 0 0 3 2 】

上述した癌の例としては、前立腺癌、膵臓癌、肺癌、非小細胞肺癌、胃癌、肝癌、腎臓癌、卵巣癌、大腸癌、直腸癌、乳房癌、甲状腺癌、皮膚癌、骨癌、基底細胞癌、扁平細胞癌、鼻咽頭癌、膀胱癌、子宮癌、皮膚癌、食道癌及び頭頸部癌が挙げられるが、これらに制限されない。

【 0 0 3 3 】

一方、本発明による抗体は、免疫疾患の予防または治療用途にも使用可能である。グレ

10

20

30

40

50

ムリン - 1 が免疫疾患と深い関係があるということがいくつかの文献により立証された (Mezzano S, et al. (2007) Expression of gremlin, a bone morphogenetic protein antagonist, in glomerular crescents of pauci-immune glomerulonephritis. Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association 22(7):1882-1890)。

【0034】

このため、本発明によるグレムリン - 1 を抑制する抗体は、免疫疾患を予防または治療するのに使用可能である。

【0035】

前記免疫疾患の例としては、関節リウマチ (rheumatoid arthritis)、全身性進行性硬化症 (Progressive systemic sclerosis、Scleroderma)、全身性紅斑性狼瘡 (lupus)、アトピー皮膚炎、円形脱毛症 (alopecia areata)、乾癬、天疱瘡、喘息、アフタ性潰瘍、慢性甲状腺炎、後天性再生不良貧血、原発性胆汁性肝硬変、潰瘍性大腸炎、ベーチェット病 (Behcet's disease)、クローン病、珪素肺症、石綿肺症、IgA 腎臓疾患、連鎖球菌感染後糸球体腎炎 (PSGN)、シェーグレン症候群 (Sjogren Syndrome)、ギラン・バレー症候群 (Guilian-Barre syndrome)、皮膚筋炎 (dermatomyositis)、多発性筋炎 (polymyositis)、多発性硬化症 (multiple sclerosis)、自己免疫性溶血性貧血 (Autoimmune hemolytic anemia)、自己免疫性脳脊髄炎、重症筋無力症 (Myasthenia gravis)、グレーブス病 (Grave's disease)、結節性多発動脈炎 (Polyarteritis nodosa)、強直性脊椎炎 (Ankylosing spondylitis)、線維筋痛症 (Fibromyalgia syndrome) 及び側頭動脈炎 (Temporal arteritis) が挙げられるが、これらに制限されない。

【0036】

一方、本発明は、本発明による抗体を含む癌または免疫疾患診断用キットを提供する。前記キットは、本発明による抗体に加えて、免疫組織化学染色法のための通常の試薬などをさらに含むことができる。さらに含まれ得る構成要素としては、FITC 試薬、抗原賦活液 (antigen retrieval solution)、対照群抗体、HRP-結合された重合体、DAB(3,3'-diaminobenzidine tetra chloride) 溶液、マイヤ - ヘマトキシリン液 (Mayer's hematoxylin solution) などが挙げられるが、これらに制限されない。前記キットは、正常組織と診断のための組織に標識された本発明による抗体を反応させ、これを染色して顕微鏡で観察することにより、本発明による抗体と反応した組織を、癌または免疫疾患にかかったまたは危険性のある組織であると診断することができる。

【0037】

以下、本発明を実施例に基づいて更に具体的に説明する。

但し、下記の実施例は本発明を例示するためのものに過ぎないもので、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【0038】

実施例 1 : グレムリン - 1 の発現及び精製

< 1 - 1 > 細胞培養

A549、HeLa、A172 及び A431 細胞は韓国細胞株銀行 (ソウル、韓国) から入手し、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) はインビトロジェン社 (カールスバッド

10

20

30

40

50

、カリフォルニア州)から入手した。一方、A549、A172及びA431細胞は10%ウシ胎児血清(FBS)(GIBCO社製、グランドアイランド、ニューヨーク州)入りRPMI-1640培地(ウェルジーン社製、韓国)で、HeLa細胞は10%FBS入りMinimum Essential Medium(MEM)培地(ウェルジーン社製)で、そしてHUVECは内皮細胞成長培地-2(Endothelial Growth Medium-2; EGM-2)(ロンザ社製、ウォーカーズビル、メリーランド州)で培養した。

【0039】

<1-2> グレムリン-1発現ベクターの製造及び形質感染

文献[Namkoong H et al., (2006) BMC Cancer 6: 74]の方法を参照して、ヒト子宮組織cDNAライブラリーからグレムリンcDNAを増幅させて得た。次いで、下記のPCRプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法により前記グレムリンcDNAの5'及び3'末端にHindIII及びXhoI制限酵素部位を導入した。

10

【0040】

5' - CCC AAG CTT ATG AGC CGC ACA GCC TAC
AC - 3' (配列番号29)

5' - CCG CTC GAG ATC CAA ATC GAT GGA TAT
GC - 3' (配列番号30)

【0041】

20

前記PCR産物をHindIII及びXhoIで切断した後、pcDNA3.1/myc-Hisベクター(インビトロジェン社製)内にライゲーションしてグレムリン-1発現ベクターを製造した。

【0042】

一方、形質感染の1日前に、A549細胞(5.0×10^5 細胞)をプレートに塗抹して70%コンフルエンス(confluency)に到達させた。次いで、前記製造されたグレムリン-1発現ベクターをリポフェクタミン2000試薬(インビトロジェン社製)を用いてメーカーのガイドラインに従ってA549細胞に形質感染させた。前記形質感染された細胞を1.0mg/mlの抗生剤G418(インビトロジェン社製)を用いて選別した。前記選別されたグレムリン-1発現細胞株を「グレムリン-1-A549」細胞株と命名した。

30

【0043】

上述した方式に従い、グレムリン-1が挿入されていないpcDNA3.1/myc-Hisベクター単独でA549細胞を形質感染させて「mock-A549」細胞株を得た。

【0044】

<1-3> グレムリン-1の発現及び精製

グレムリン-1及びヒトIgG-Fc融合タンパク質をコードする遺伝子を文献[Park S et al., (2010) Clin Chim Acta 411: 1238-1242]に記載の方式に従い、オーバーラッピングPCR(overlapping PCR)法を用いて製造した。前記ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に用いられたグレムリン-1及びIgG-Fcに対するリンカープライマー配列は、下記の通りである:

40

(1) グレムリン-1

F: 5' - GGC CCC ACC GGC CCC ATC CAA ATC GAT - 3' (配列番号31)

R: 5' - GGG GCC GGT GGG GCC TCG GGT GGC GG T GGC - 3' (配列番号32)

(2) IgG-Fc

F: 5' - AAG CTT GTG GCC CAG GCG GCC ATG AG

50

C C G C A C A G C C T A C - 3 ' (配列番号 3 3)

R : 5 ' - G G A T C C T C A T T T T G G C G G G G A C A G G G
A G A G - 3 ' (配列番号 3 4)

【 0 0 4 5 】

前記 PCR 産物を Hind III 及び Bam HI で切断して pCEP4 発現ベクター (インビトロジェン社製) 内にクローニングして、グレムリン - 1 - Fc 融合タンパク質を発現するベクターを製造した。

【 0 0 4 6 】

一方、HEK293F 細胞 (インビトロジェン社製) を GIBCO FreeStyleTM 293 発現培地 (インビトロジェン社製) に $0.1 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ 細胞/ml の細胞密度で培養した後、通気孔蓋体付き使い捨て三角組織培養フラスコ (コーニング社製) に移してオービタル攪拌培養器 (orbital shaking incubator; 37、8%CO₂、Minitron、INFORSHT、スイス) 上において 135rpm にて攪拌しながら培養した。形質感染の 1 日前に、前記細胞培養物に新鮮な培地を添加して 1.0×10^6 細胞/ml の密度に希釈し、 2.0×10^6 細胞/ml の密度に達するまで培養した。次いで、前記 HEK293 細胞をリポフェクタミン 2000 (インビトロジェン社製) を用いて上述した グレムリン - 1 及び ヒト IgG - Fc 融合タンパク質を発現するベクターで形質感染させた。形質感染された細胞を再びオービタル攪拌培養器で培養し、形質感染の 3 日目に培養上澄み液を回収した。次いで、文献 [Park Set al., (2010) Clin Chim Acta 411: 1238 - 1242] に記載の過程に従い、タンパク質 A 親和性クロマトグラフィを用いて グレムリン - 1 - Fc 融合タンパク質を精製した。

【 0 0 4 7 】

実施例 2 : グレムリン - 1 抗体の生成

< 2 - 1 > 免疫化

5 μg の グレムリン - 1 - Fc を 2 mL の リン酸緩衝食塩水 (PBS) と混合し、37 で 30 分間培養して、これを 2% スクワレン中に毒素が除去された内毒素である MPL (monophosphorylate lipid A species) 及びマイコバクテリアの細胞壁成分である TDW 及び CWS を含有する乳中水乳化液である補助剤 (シグマ社製、セントルイス、ミズーリ州) に乳化させた後、ニュージーランド産の白いウサギに注入した。免疫化を 3 週おきに 3 回行った。免疫化されたウサギの抗体力価 (titer) を二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 共役のマウス抗ウサギ IgG 多クローン抗体 (ピラス・ケミカル社製、ロックフォード、イリノイ州) を用いて酵素結合免疫吸着分析 (ELISA) によって決定した。

【 0 0 4 8 】

前記免疫化されたウサギの脾臓及び骨髄から TRI 試薬 (インビトロジェン社製) を用いて総 RNA を得た。抽出された脾臓及び骨髄をホモジナイザーを用いて 50% アウトプット (output) において 1 分間 TRI 試薬中において均質化させ、室温下で 5 分間培養した。均質化された試料を 4 で 10 分間 2,500g において遠心分離した。上澄み液を 50 mL の遠心分離チューブに移し、各上澄み液に 3 mL の 1 - プロモ - 3 - クロロ - プロパン (BCP) (シグマ社製) を添加した。次いで、前記混合物を 15 秒間ボルテックスし (vortexing)、室温下で 15 分間培養した。混合物を 4 で 15 分間 17,000g において遠心分離し、無色の上層水性相を新たな 50 mL のチューブに移した。次いで、15 mL のイソプロパノールを添加して室温下で 10 分間培養した。4 で 15 分間 17,500g において遠心分離した後、上澄み液を丁寧に除去し、ペレットを再懸濁させずに 30 mL の 75% エタノールで洗浄した。ペレットを 10 分間再び遠心分離して上澄み液を除去した後、ペレットを室温下で空気乾燥した。次いで、ペレットを RNase のない水に溶解させ、-80 に保管した。260nm において光学密度を測定して RNA 濃度を決定し (40 ng/μL の RNA が OD260 = 1 を生成する)、純度を OD260/OD280 の割合によって計算した (通常、1.6 ~ 1.9 の範囲である

）。

【0049】

< 2 - 2 > 総RNAからの第一鎖cDNAの合成

オリゴ(dT)プライミング(priming)を有する第一鎖cDNA合成キットに対するスーパーSCRIPTTM IIIシステム(インビトロジェン社製)を用いて第一鎖cDNAを合成した。前記分離された5 µgの総RNAを1 µLの0.5 µg/µLオリゴ(dT)、1 µLの10 mM dNTP及びジエチルピロカーボネート(DEPC)で処理された水と混合して最終的な体積を10 µLに調整した。前記混合物を65 °Cで5分間培養し、氷中で冷却した。前記RNA試料に2 µLの10倍濃度反応緩衝液、4 µLの25 mM MgCl₂、2 µLの100 mMジチオトレイトール(DTT)、1 µLのRNase OUT(リボヌクレアーゼ阻害剤)及び1 µLのSuperScript III逆転写酵素を添加し、50 °Cで50分間培養した。85 °Cで5分間培養した後、氷中で冷却して反応を終了した。次いで、1 µLのRNase Hを添加し、37 °Cで20分間培養した。前記第一鎖cDNAを-20 °Cで保管した。

10

【0050】

< 2 - 3 > 1次PCR

ウサギの脾臓及び骨髄から得た第一鎖cDNAに対してExpand High Fidelity PCRシステム(ロシュ・モレキュラーシステムズ社製、インディアナ州、米国)を用いた30サイクルのPCRを行った。ウサギV_L(9 × V_K及び1 × V_H)コード配列の増幅のための10個のプライマー組み合わせ及びウサギV_Hコード配列(表1)の増幅のための4つの組み合わせを併用した。各反応において、1 µLのcDNAを60 pmolの各プライマー、10 µLの10倍濃度反応緩衝液、8 µLの2.5 mM dNTP(プロメガ社製、マディソン、ウィスコンシン州)、0.5 µLのTaq DNA重合酵素及び水と混合して最終的な体積を100 µLに調整した。下記の条件下でPCRを行った: 94 °Cで15秒、56 °Cで30秒及び72 °Cで90秒の30サイクル後に、72 °Cで10分間の最終延長。約350 bpの長さを有する断片を1.5%アガロースゲルに搬入して電気泳動した後、QIAEXIIゲル抽出キット(キアゲン社製、バレンシア、カリフォルニア州)を用いて精製した。精製されたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)産物をOD 260 nmにおいて読み取って定量した(1 OD単位 = 50 µg/mL)。

20

【0051】

< 2 - 4 > 2次PCR

2次PCRにおいて、1次V_L産物をオーバーラップ延長PCRによって1次V_H産物とランダムに連結した(表2)。長いリンカーの単鎖断片に対して少なくとも10回の反応を行った。各反応において、100 ngの精製された軽鎖産物及び重鎖産物を60 pmolの各プライマー、10 µLの10倍濃度反応緩衝液、8 µLの2.5 mM dNTP(プロメガ社製)、0.5 µLのTaq DNA重合酵素及び水と混合して最終的な体積を100 µLに調整した。下記の条件下でPCRを行った: 94 °Cで15秒、56 °Cで30秒及び72 °Cで2分の20サイクル後に、72 °Cで10分間の最終延長。約700 bpの大きさの断片を1.5%アガロースゲルに搬入して電気泳動した後、QIAEXIIゲル抽出キット(キアゲン社製、バレンシア、カリフォルニア州)を用いて精製した。精製されたPCR産物をOD 260 nmにおいて読み取って定量した(1 OD単位 = 50 µg/mL)。

30

40

【0052】

< 2 - 5 > 精製されたオーバーラップ延長産物及びベクターDNAの制限酵素処理

PCR産物及びpComb3Xベクター(スクリプス研究所製)をクローニングのためにSfiI制限酵素で処理した。10 µgの精製されたオーバーラップPCR産物を360ユニットのSfiI(1 µgのDNA当たり16ユニット、ロシュ・モレキュラーシステムズ社製)、20 µLの10倍濃度反応緩衝液M及び水と混合して最終的な体積を200 µLに調整した。20 µgのpComb3Xベクターを120ユニットのSfiI(1 µgのDNA当たり6ユニット、ロシュ・モレキュラーシステムズ社製)、20 µL

50

の10倍濃度反応緩衝液M及び水と混合して最終的な体積を200 μ Lに調整した。前記混合物を50 $^{\circ}$ Cで5時間培養した。約700bpの長さを有する切断された挿入物を1%アガロースゲルで精製し、約3,400bpの長さを有するベクターDNA及びpComb3Xベクター内に含有されている約1,600bpの長さを有する断片を0.6%アガロースゲルで精製した。

【0053】

< 2 - 6 > 処理されたオーバーラップPCR産物とベクターDNAのライゲーション (ligation)

高効率のライゲーション及び形質転換のためのベクター並びに挿入物の適合性を評価するために、小規模のライゲーションを行った。ベクターDNAのSfiI処理物のみを含むライゲーション反応を5%未満のライブラリーサイズであるバックグラウンドライゲーションに対して評価した。ライゲーションのために、140ngのSfiIで処理されて精製されたベクターDNA及び70ngのSfiIで処理されて精製されたPCR産物またはスタッファーDNA、4 μ Lの5倍濃度リガーゼ緩衝液、1 μ LのT4リガーゼ(インビトロジェン社製)及び水を混合して総体積を20 μ Lに調整した。前記ライゲーション混合物を室温下で4時間培養した。前記ライゲーションされた産物1 μ Lを0.2cmキューベット及び遺伝子パルサー(GenePulser; バイオラッドラボラトリーズ製、ハーキュリーズ、カリフォルニア州)を用いて2.5kV、25 μ F及び200 μ sで電気穿孔法によって50 μ LのER2738エレクトロコンピテント細胞(NEB)内に形質転換させた。前記細胞を3mLのSB培地に再懸濁させ、225~250rpmで攪拌しながら37 $^{\circ}$ Cで1時間培養した。形質転換体の総数をLB+カルベニシリンプレートの上に1 μ L、10 μ L及び100 μ Lを塗抹して決定した。理想的には、最終的なライブラリーの大きさはベクターDNA μ gに対して少なくとも 10^8 集落形成単位(cfu)にならなければならない。5%バックグラウンドライゲーション未満でなければならない。

【0054】

< 2 - 7 > エレクトロコンピテント大腸菌の製造

大腸菌ER2738菌株を15mLのSB入り50mLのポリプロピレンチューブで培養し、250rpmにて攪拌しながら37 $^{\circ}$ Cで一晩中成長させた。翌日に、2.5mLの培養物を500mLのSB、10mLの20%(w/v)グルコース及び5mLの1MMgCl₂入り2Lフラスコ内に希釈させ、600nmにおけるODが0.8~0.9に達するまで37 $^{\circ}$ Cで250rpmで攪拌した。次いで、培養物を予め冷却した500mLの遠心分離瓶に入れ、4 $^{\circ}$ Cで20分間3,000gにおいて遠心分離した。上澄み液を除去し、ペレットを予め冷却した30mLの10%(v/v)グリセロールに再懸濁させた。再懸濁されたペレットを遠心分離し、グリセロールで3回洗浄した後、5mLの10%グリセロールに再懸濁して-80 $^{\circ}$ Cで保管した。

【0055】

< 2 - 8 > ヘルパーファージの製造

< 2 - 7 >において製造された10 μ LのER2738懸濁液を10mLのSB培地に接種し、37 $^{\circ}$ Cで1時間250rpmにて攪拌した。新たに製造されたプレートから得た単一ヘルパーファージプラークをピペットチップを用いて培養物内に移した。前記感染された10mLの培養物をカナマイシン入りの予め加熱した(37 $^{\circ}$ C)SB培地500mL入りの2Lの三角フラスコに移して最終的な濃度を70 μ g/mLに調整した後、37 $^{\circ}$ Cで一晩中250rpmにて攪拌した。翌日に、培養物を2,500gにおいて15分間遠心分離し、上澄み液を水槽中において70 $^{\circ}$ Cで20分間培養した。2,500gにおいて15分間遠心分離した後、上澄み液を新たな50mLのポリプロピレンチューブに移して4 $^{\circ}$ Cで保管した。

【0056】

< 2 - 9 > ライブラリーライゲーション及び形質転換

1.4 μ gのSfiIで切断したpComb3X、700ngの< 2 - 5 >において得

10

20

30

40

50

た、SfiIで切断されたPCR産物、40 μ Lの5倍濃度リガーゼ緩衝液、10 μ LのT4 DNAリガーゼ及び水（最終的な体積を200 μ Lに調整する）を用いてライブラリーライゲーションを行った。前記ライゲーション混合物を室温で一晩中培養した後、-80 $^{\circ}$ Cで一晩中エタノールで沈殿させた。マイクロ遠心分離器を用いて最高の速度にて4 $^{\circ}$ Cで15分間遠心分離した後、上澄み液を除去し、ペレットを1mLの70%（v/v）エタノールで洗浄して乾燥させた。ペレットを15 μ Lの水に溶解させた。前記結させられたライブラリーサンプルを300 μ Lのエレクトロコンピテント大腸菌内に形質転換させ、5mLのSB培地において37 $^{\circ}$ Cで1時間培養した。前記培養物に100mLの予め加熱したSB培地及び3 μ Lの100mg/mLカルベニシリンを添加した。50 μ g/mLのカルベニシリンを含有するLB培地に前記培養物0.1 μ L、1 μ L及び10 μ Lを塗抹してライブラリーの大きさを決定した。培養物を250rpmにて1時間攪拌した。前記培養物に4.5 μ Lの100mg/mLカルベニシリンを添加して1時間さらに攪拌した。前記培養物に2mLのVCSM13ヘルパーファージ、183mLの予め加熱したSB及び92.5 μ Lの100mg/mLのカルベニシリンを添加して300rpm及び37 $^{\circ}$ Cで2時間攪拌した。前記培養物に280 μ Lの50mg/mLのカナマイシンを添加し、前記培養物を300rpm及び37 $^{\circ}$ Cで一晩中攪拌した。翌日に、培養物を3,000gにおいて4 $^{\circ}$ Cで15分間遠心分離した。上澄み液を500mLの遠心分離瓶に移し、次いで、8gのポリエチレングリコール（PEG）-8000及び6gのNaClを添加した。氷中で30分間保管した後、上澄み液を15,000gにおいて4 $^{\circ}$ Cで15分間遠心分離した。上澄み液を廃棄し、ファージペレットを1%ウシ血清アルブミン（BSA）を含有するトリス緩衝食塩水（TBS）に再懸濁させた。

【0057】

< 2 - 10 > 固定化された抗原上におけるライブラリーのパニング

常磁性ビーズ（ダイナル・バイオテック社製、レイクスアクセス、ニューヨーク州）を用いてバイオパニングを行った。3 μ gのグレムリン-1を室温下で20時間 1×10^7 ビーズと結合させた。前記ビーズをリン酸緩衝生理食塩水（Phosphate buffered saline; PBS）で4回洗浄し、ブロッキング緩衝液とともに室温下で1時間培養した。グレムリン-1と結合したビーズを< 2 - 9 >において得たscFvをディスプレイするファージとともに室温下で2時間培養した。前記洗浄段階を1次における3回から後続する4次においては10回に増やした。結合されたファージを50 μ Lの0.1Mグリシン/HCl（pH2.2）を用いて溶出させ、3 μ Lの2M Tris-HCl（pH9.1）によって中和させた。このようなファージ入り上澄み液を用いてER2738を感染させ、ファージミドを一晩中増幅するためにヘルパーファージVCSM13を用いてレスキュー（rescue）した。翌日に、< 2 - 9 >において上述したようにPEG-8000及びNaClを添加してファージを製造した。なお、前記ファージにより感染された培養物を50 μ g/mLのカルベニシリンを含有するLBプレートの上に塗抹して投入（input）及び生産（output）ファージ力価を決定した。

【0058】

< 2 - 11 > ファージELISAによるクローンの選別

追加の分析のために選ばれた個別クローンからscFv結合を確認するために、精製された組換えグレムリン-1に対してscFvをディスプレイするファージを用いてELISAを行った。グレムリン-1によりコーティングされたマイクロタイタープレートをリン酸緩衝生理食塩水（PBS）中の3%のウシ血清アルブミン（BSA）を用いて37 $^{\circ}$ Cで1時間ブロッキングした。次いで、ファージ上澄み液をPBS中の6%BSAと同様に混合し、37 $^{\circ}$ Cで1時間培養した。0.05%の Tween added Phosphate Buffered Saline（TBST）で洗浄した後、プレートをHRPの結合された抗M13抗体（1:5000希釈、ピアス・ケミカル社製）とともに培養した。色相反応のために、2,2'-アジノ-ビス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸；ABTS）基質溶液（アマレスコ社製、ソロン、オハイオ州）を使用した。

s c F v断片を全長I g Gに転換させて過発現させた。本発明による抗体(O - 13)の特異性をウェスタンブロット分析法を用いて決定した。本発明による抗体(O - 13)の特異性を決定するために、p c D N A 3 . 1 / m y c - H i s - グレムリン - 1で形質感染されたH E K 2 9 3 F細胞の培養上澄み液をドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動(S o d i u m D o d e c y l S u l f a t e - P o l y a c r y l a m i d e G e l E l e c t r o p h o r e s i s ; S D S - P A G E)で分離した。ブロットを100ng/mLの本発明による抗体(O - 13)と4で一晚中培養した後、H R Pの結合された抗ヒトI g G (F c特異的、1 : 1000希釈; ピアス・ケミカル社製)とともに室温下で1時間培養した。ブロットをメーカーのガイドラインに従い、向上された化学発光システム(ピアス社製)を用いて視覚化させた。ゲルをメーカーのガイドラインに従い、クマシーブリリアントブルーG - 250(シグマ社製)を用いて視覚化させた。

10

前記過程により得た7種類の抗体をそれぞれR - 80、R - 88、O - 1、O - 13、O - 26、J - 1及びO - 13(ヒト化)抗体と命名し、アミノ酸及び塩基配列を分析した。

配列分析の結果、前記R - 80抗体は、配列番号1のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号2のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、R - 88抗体は、配列番号3のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号4のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、O - 1抗体は、配列番号5のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号6のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、O - 13抗体は、配列番号7のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号8のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、O - 26抗体は、配列番号9のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号10のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、J - 1抗体は、配列番号11のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号12のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、O - 13(ヒト化)抗体は、配列番号13のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域及び配列番号14のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む。

20

予備実験により、前記抗体のうち最も優れた効果を有するO - 13抗体を今後の実験に供試した。

【0059】

実施例3：グレムリン - 1の癌細胞との相互作用の分析

30

グレムリン - 1が癌細胞と直接的に相互作用するかどうかを調べるために、グレムリン - 1を4種類の癌細胞(A549、HeLa、A172及びA431)と共に培養した後、フローサイトメトリーにより分析した。

具体的に、付着細胞をトリプシンで処理し、リン酸緩衝食塩水(PBS)中の1%(w/v)ウシ血清アルブミン(BSA)で洗浄した。懸濁細胞を500×gにおいて2分間遠心分離して回収し、PBS中の1%(w/v)BSAで洗浄した。全ての細胞をPBS中の1%(w/v)BSAで100nMの最終濃度のヒスチジンヘキサマータグ(His-tag)を有するグレムリン - 1(R&Dシステムズ社製、ミネアポリス、ミネソタ州)と共に37で1時間培養した。次いで、細胞をPBS中の1%(w/v)BSAで2回洗浄し、5µg/mLの最終濃度のFITC-結合されたHis抗体(アブカム社製、ケンブリッジ、イギリス)と共に暗所で37で30分間培養した。次いで、細胞をPBS中の1%(w/v)BSAで2回洗浄し、FACSCantoIIフローサイトメーター(BDバイオサイエンス社製、サンノゼ、カリフォルニア州)上において分析する前に500µLのPBSに再懸濁させた。

40

一方、グレムリン - 1抗体(O - 13)の中和効能を分析するために、細胞をヒスチジンヘキサマータグ(His-tag)を有するグレムリン - 1100nM及びPBS中の1%(w/v)BSA中の10µMの本発明による抗体(O - 13)と共に37で1時間培養した後、FITCの結合されたHis抗体(アブカム社製)で探針させた。

【0060】

A549細胞を1µMのBMP - 2、BMP - 4またはBMP - 7(R&Dシステムズ

50

社製、ミネアポリス、ミネソタ州)及び100nMのグレムリン-1-Fcで同時に処理し、37℃で1時間培養した。細胞をFITCの結合されたIgG-Fc特異的抗体(5µg/ml、インビトロジェン社製)で探針させた。次いで、細胞をFACSCantoIIフローサイトメーター上において分析した。

前記実験結果を図1に示す。同図に示すように、グレムリン-1は癌細胞株と直接的に相互作用し、これはグレムリン-1抗体によって抑制された。

【0061】

実施例4：グレムリン-1と癌細胞との相互作用に対する血管内皮成長因子受容体-2(VEGFR2)の影響

グレムリン-1と細胞株との相互作用がグレムリン-1の唯一に知られている細胞表面受容体であるVEGFR2によって媒介されるか否かを評価した。

【0062】

<4-1> フローサイトメトリー

グレムリン-1がヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)と結合するか否かを実施例3と同じ過程に従い、フローサイトメトリーによって分析した。前記結果を図2Aに示す。同図に示すように、グレムリン-1はHUVECと結合しなかった。HUVECがVEGFR2を発現するため、グレムリン-1がHUVECと結合しないということは、グレムリン-1がVEGFR2とは無関係に癌細胞に結合するということを示唆する。

【0063】

<4-2> RT-PCR

A549細胞、HeLa細胞及びHUVEC細胞におけるVEGFR2 mRNA及びタンパク質の発現をRT-PCR及び免疫プロット分析法を用いて確認した。

具体的に、RT-PCRのために、トリゾール試薬(インビトロジェン社製)を用いてメーカーのガイドラインに従い、A549細胞、HeLa細胞及びHUVECから総RNAを分離した。次いで、前記RNAからスーパースクリプト(Superscript^R)III第一鎖(First-Strand)合成システム(インビトロジェン社製)を用いてcDNAを合成した。下記のプライマーを用いて2720サーマルサイクラー(アプライドバイオシステムズ社製、フォスターシティ、カリフォルニア州)においてRT-PCRを行った。RT-PCRは94℃で30秒、56℃で30秒及び72℃で1分間35サイクルで行った。

【0064】

(1) VEGFR-2

F: 5' - TGATCGGAAATGACACTGGA - 3' (配列番号35)

R: 5' - TGCTTCAACAGAAGACCATGC - 3' (配列番号36)

(2) グレムリン-1

F: 5' - AACAGTCGCACCATCATCAA - 3' (配列番号37)

R: 5' - AATTTCTTGGGCTTGCAGAA - 3' (配列番号38)

(3) GAPDH

F: 5' - AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG - 3' (配列番号39)

R: 5' - AGGGGTCAATTGATGGCAACA - 3' (配列番号40)

【0065】

前記RT-PCR結果を図2Bに示す。図2Bに示すように、HUVEC細胞にはVEGFR2が存在するが、A549及びHeLa細胞からはVEGFR2が検出されなかった。実施例3において、グレムリン-1が癌細胞と相互作用したにも関わらず、VEGFR2 mRNAが検出されなかったということは、グレムリン-1と癌細胞との相互作用がVEGFR2によって媒介されないということを示す。

【0066】

<4-3> 免疫プロット分析

HUVEC、A549細胞及びHeLa細胞をプロテアーゼ抑制剤カクテル(シグマアルドリッチ社製、セントルイス、ミズーリ州)を含有する冷たい溶解緩衝液[50mM

10

20

30

40

50

Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、2 mM EDTA、1% Triton-X100、0.1% SDS、1 mM PMSF]に溶解させた後、文献[Lee MS et al., (2008) Hybridoma (Larchmt) 27: 18-24]に記載の過程に従いウェスタンブロットを行った。このとき、一次抗体として VEGFR-2 (1:1,000 希釈; セル・シグナリング・テクノロジー社製、ダンバース、マサチューセッツ州) 及び α -アクチン (1:10,000 希釈; アプライドバイオロジカルマテリアルズ社製、リッチモンド、ブリティッシュコロンビア州) 抗体を使用し、二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) の結合された抗マウス IgG (1:1,000 希釈; ピアス・ケミカル社製、ロックフォード、イリノイ州) または HRP の結合された抗ウサギ IgG (1:1,000 希釈; ピアス・ケミカル社製) を使用した。ブロットを増強された化学発光システム (ピアス社製) を用いてメーカーのガイドラインに従い視覚化させた。

10

前記免疫ブロット分析実験結果を図 2 C に示す。図 2 C に示すように、HUVEC とは異なり、A549 及び HeLa 細胞は VEGFR2 を発現しなかった。前記結果もまた、グレムリン-1 と癌細胞との相互作用が VEGFR2 によって媒介されないことを示す。

【0067】

実施例 5 : グレムリン-1 と癌細胞との相互作用に対する BMP の影響

グレムリン-1 は、BMP-2、BMP-4 及び BMP-7 に特異的に結合してこれらの活性を抑制する BMP 拮抗剤である。BMP は多くの組織の形態の形成及び恒常性において重要な役割を果たすと知られている多機能性成長因子である。また、BMP-2、BMP-4 及び BMP-7 は乳房癌及び前立腺癌をはじめとする様々な癌において頻りに過発現される (Singh A et al., (2010) Cytokine Growth Factor Rev 21: 299-313; Chen D et al., (2004) Growth Factors 22: 233-241; Bobinac D et al., (2005) Croat Med J 46: 389-396)。BMP-4 は BCC 細胞の増殖を減少させ、グレムリン-1 の添加は BMP-4 の抗増殖効果を間接的に減少させることが報告されている (Sneddon JB et al., (2006) Proc Natl Acad Sci U S A 103: 14842-14847)。このため、BMP がグレムリン-1 と癌細胞との相互作用に影響を及ぼすか否かを調べてみた。

20

30

【0068】

< 5 - 1 > 酵素免疫分析

まず、グレムリン-1 が BMP と結合するか否かを調べるために、下記のようにして酵素免疫分析を行った。具体的に、マイクロタイプレート (コーニング・コスター社製、ケンブリッジ、マサチューセッツ州) を 100 nM の BMP-2、BMP-4 または BMP-7 (R&D システム社製) でコーティングし、PBS 中の 1% (w/v) 脱脂油でブロックした。次いで、各ウェルにグレムリン-1-Fc (10 nM) 単独及びグレムリン-1-Fc (10 nM) と 500 nM の本発明による抗体 (O-13) との組み合わせを添加した。洗浄後に、プレートを HRP の結合された IgG-Fc に特異的な抗体 (1:5,000 希釈; ピアス・ケミカル社製) とともに培養した。次いで、文献 [Chung J et al., (2004) FASEB J 18: 361-363] に従い、2,2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸; ABTS) 基質溶液 (アムレスコ社製、ソロン、オハイオ州) を用いて発色反応 (coloring reaction) をさせ、405 nm における吸光度を測定した。前記結果を図 3 A に示す。図 3 A に示すように、グレムリン-1 は BMP-7 を除く BMP-2 及び BMP-4 と相互作用することが分かり、本発明による抗体 (O-13) はグレムリン-1 と BMP-2 または BMP-4 との相互作用にいかなる影響も及ぼさなかった。

40

【0069】

< 5 - 2 > フローサイトメトリー

50

A549細胞とグレムリン-1を反応させ、ここに10倍モル過量のBMP-2、BMP-4及びBMP-7を加えた後、実施例3の方法と同様にしてフローサイトメトリーを行った。前記結果を図3Bに示す。図3Bに示すように、BMPの存在はグレムリン-1のA549細胞との相互作用に影響を及ぼさなかった。これらの結果は、グレムリン-1にA549細胞とBMPとの相互作用を媒介する2つの別途のモチーフが存在することを示唆する。

【0070】

実施例6：グレムリン-1及びこの抗体が癌細胞の分散及び移動に及ぼす効果の分析

<6-1> 細胞分散の分析

グレムリン-1処理時における癌細胞の形状を調べるために、A549細胞をクリスタルバイオレット染色法により分析した。具体的に、A549細胞を24ウェルプレート(1.0×10⁴細胞/ウェル)に塗抹し、100nMのヒスチジンヘキサマータグ(His-tag)を有するグレムリン-1で3日間処理した。培地を除去し、細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄した後、PBS中の4%パラホルムアルデヒドで10分間固定させた。細胞を蒸留水中の0.05%クリスタルバイオレットで30分間染色した。文献[Li XL et al., (2009) Cancer Chemother Pharmacol 64: 1097-1104]に開示された方法に従い染色溶液を除去し、細胞をPBSで3回洗浄した。ライカDFL290カメラ(ライカマイクロシステムズ社製、ヴェッツラー、ドイツ)を用いてイメージを得、これをライカ・アプリケーション・スイート・ソフトウェア(ライカマイクロシステムズ社製)を用いて分析した。

前記撮影されたイメージを図4Aに示す。図4Aに示すように、グレムリン-1で処理されたA549細胞はその形状が繊維芽細胞とほとんど同様であり、細胞が分散されたことが分かる。

【0071】

<6-2> E-カドヘリン発現変化の分析

E-カドヘリン(E-cadherin)の下向き調節は上皮間葉移行(epithelial-mesenchymal transition; EMT)と関連があり、癌が進行したときにE-カドヘリン及び上皮間葉移行(EMT)の抑制が共通して観察される(Perl AK et al., (1998) Nature 392: 190-193)。このため、免疫プロット分析法及び免疫蛍光染色によりグレムリン-1処理によるE-カドヘリンの発現の変化を調べてみた。

免疫プロット分析の場合、A549細胞(1.0×10⁵細胞/ウェル)を60mmのディッシュの上に塗抹し、50%コンフルエンスまで成長させた。前記細胞を100nMのヒスチジンヘキサマータグ(His-tag)を有するグレムリン-1で3日間処理した。前記細胞をプロテアーゼ抑制剤カクテル(シグマアルドリッチ社製、セントルイス、ミズーリ州)を含有する冷たい溶解緩衝液[50mM Tris-HCl(pH7.4)、150mM NaCl、2mM EDTA、1% Triton-X100、0.1% SDS、1mM PMSF]に溶解させた後、文献[Lee MS et al., (2008) Hybridoma (Larchmt) 27: 18-24]に記載の過程に従いウェスタンプロットを行った。このとき、一次抗体としてE-カドヘリン(1:1,000希釈; アブカム社製)及びβ-アクチン(1:10,000希釈; アプライドバイオロジカルマテリアルズ社製、リッチモンド、ブリティッシュコロンビア州)抗体を使用し、二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ(Horseradish peroxidase, HRP)の結合された抗マウスIgG(1:1,000希釈; ピアス・ケミカル社製、ロックフォード、イリノイ州)またはHRPの結合された抗ウサギIgG(1:1,000希釈; ピアス・ケミカル社製)を使用した。前記プロットを増強された化学発光システム(ピアス社製)を用いてメーカーのガイドラインに従い視覚化させた。

【0072】

前記結果を図4Bに示す。図4Bに示すように、グレムリン-1で処理されたA549

細胞においてE - カドヘリン(E - c a d h e r i n)の発現が大幅に減少した。

また、免疫蛍光染色の場合、A 5 4 9細胞(1.0×10^5 細胞/ウェル)をポリL - リシン($100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、シグマ社製)によりコーティングされたガラスカバースリットの上に塗抹し、50%コンフルエンスまで成長させた。細胞を100nMのヒスチジンヘキサマータグ(H i s - t a g)を有するグレムリン - 1で3日間処理し、PBSで洗浄した後、PBS中の4%パラホルムアルデヒドで常温下で30分間固定させた。固定された細胞をPBS中の0.2%トリトンX - 100(ツイーン添加リン酸緩衝生理食塩水(PBST))で常温下で10分間透過させた後、PBST中の1%ゼラチンで常温下でブロッキングした。E - カドヘリン抗体(アブカム社製)後にアレクサ(Alexa)488の結合された二次抗体(インビトロジェン社製)を用いて免疫蛍光染色を行った。核は4',6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール(DAPI)(rhodamine-phalloidin 1:1,000希釈;インビトロジェン社製)で染色し、アクチンフィラメントはローダミン・ファロイジン(1:1,000希釈;インビトロジェン社製)を用いて染色した。カバースリットを退色防止剤(anti-fading agent)を有する水溶性マウンティング培地(aqueous mounting medium)を用いてガラススリットの上に載せた。次いで、LSM 5 PASCALレーザースキャニング顕微鏡(カール・ツァイス社製、ドイツ)を用いてイメージを得、これをLSM 5 PASCALソフトウェアを用いて分析した。

前記結果を図4Cに示す。図4Cに示すように、グレムリン - 1で処理されたA 5 4 9細胞においてE - カドヘリン(E - c a d h e r i n)の発現が大幅に減少された。

【0073】

< 6 - 3 > 細胞移動の分析

細胞の移動有無を確認するために、下記のようにして細胞移動分析を行った。具体的に、細胞を1ウェル当たり 1.0×10^5 細胞の密度で24ウェルプレートに塗抹した。ピペットチップでスクラッチして傷を付けた。脱着された細胞を除去するために培地で洗浄した後、前記培養物に100nMのヒスチジンヘキサマータグ(H i s - t a g)を有するグレムリン - 1を24時間添加した。直後に、且つ、24時間後にライカDFL290カメラ(ライカマイクロシステムズ社製)を用いてイメージを分析した。スクラッチにより形成された面積を通じて細胞が移動した距離を24時間目に傷付幅を測定し、開始時点の傷付幅からこれを差し引くことにより決定した。次いで、前記得られた値を従来の技術に従い未処理の細胞の移動距離を100%に設定して%移動で表した。

本発明による抗体(O - 13)の中和効能を決定するために、傷付いた細胞をヒスチジンヘキサマータグ(H i s - t a g)を有するグレムリン - 1単独または $10 \mu\text{M}$ の本発明による抗体(O - 13)(または、 $10 \mu\text{M}$ の対照群抗体)とともに24時間培養した。上述したようにして距離を決定した。

同じプロトコルを用いて、Mockの形質感染されたA 5 4 9細胞及びグレムリン - 1で形質感染されたA 5 4 9細胞を塗抹し、傷を付けた。Mock - A 5 4 9細胞はいかなる処理なしに培養したのに対し、グレムリン - 1 - A 5 4 9細胞は $10 \mu\text{M}$ の本発明による抗体(O - 13)または対照群抗体の存在下で24時間培養した。上述したようにして距離を決定した。結果は、3回の独立した実験の代表値である。

前記測定結果を図4Dに示す。図4Dに示すように、グレムリン - 1で処理した場合、A 5 4 9細胞の移動が大幅に増大され、これは、中和抗体を添加したときに完全に消失した。

これらの結果は、グレムリン - 1が癌細胞の分散及び移動を誘導し、これをグレムリン - 1抗体を用いて抑制することができることを示す。

【0074】

実施例7:グレムリン - 1で形質感染されたA 6 5 4 9細胞の特性の究明

< 7 - 1 > グレムリン - 1 mRNA及びタンパク質発現量の測定

実施例< 1 - 2 >において製造された「グレムリン - 1 - A 5 4 9」細胞株及び「mock - A 5 4 9」細胞株に対して、グレムリン - 1転写体及びタンパク質の数値変化を上述した逆転写酵素 - ポリメラーゼ連鎖反応(RT - PCR)及びウェスタンブロットに

10

20

30

40

50

よって確認した。

前記実験結果を図5Aに示す。図5Aに示すように、mock-A549細胞株においてはグレムリン-1 mRNA及びタンパク質が発現されなかったのに対し、グレムリン-1-A549細胞株においてはその数値が急増した。

【0075】

<7-2> E-カドヘリン発現量の測定

また、下記のように免疫ブロット分析方法に従い、E-カドヘリンの発現量を測定した。具体的に、グレムリン-1-A549細胞及びMock-A549細胞(1.0×10^5 細胞/ウェル)を60mmディッシュの上に塗抹して50%コンフルエンスまで成長させた。Mock-A549細胞を処理なしに培養し、グレムリン-1-A549細胞を10 μ Mの本発明による抗体(O-13)または対照群抗体(パリビズマブ(Palivizumab)、シナジス、アボット・ラボラトリーズ製、アボットパーク、イリノイ州)の存在下で24時間培養した。細胞を溶解させ、実施例6に記載の免疫ブロット分析方法に従い分析した。

10

前記結果を図5Bに示す。図5Bに示すように、E-カドヘリン発現はMock-A549細胞と比較してグレムリン-1-A549細胞において減少し、中和抗体を添加した場合に僅かに増加した。

【0076】

<7-3> 細胞浸潤の分析

細胞外マトリックス(extra-cellular matrix: ECM)によりコーティングされた内側チャンパー(ケミコン社製、テメキュラ、カリフォルニア州)を用いてメーカーのガイドラインに従い細胞浸潤分析を行った。Mock-A549細胞及びグレムリン-1-A549細胞(3.0×10^5 細胞/ウェル)を300 μ Lの無血清培地に懸濁させた。プレートの底面ウェルに10%ウシ胎児血清(FBS)を含有する完全培地(500 μ L)を添加した。細胞を48時間培養した。非移動細胞を除去し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄した。膜をPBS中の4%パラホルムアルデヒドで固定させ、クリスタルバイオレット染色溶液(ケミコン社製)で染色した。ライカDFL290カメラ(ライカマイクロシステムズ社製)を用いてイメージを得、これをライカ・アプリケーション・スイート・ソフトウェアを用いて分析した。移動された細胞を1ウェル当たり4個の別途のフィールドにおいて計数した。次いで、得られた値をMock-A549細胞の細胞数を100%に設定して%浸潤で表した。

20

30

前記結果を図5Cに示す。図5Cに示すように、Mock-A549細胞と比較してグレムリン-1-A549が遥かに多量移動した。

【0077】

<7-4> 細胞移動の分析

実施例6に記載の方法に従い細胞移動分析を行った。Mock-A549細胞及びグレムリン-1-A549細胞を塗抹し、傷を付けた。Mock-A549細胞は何の処理なしに培養し、グレムリン-1-A549細胞は10 μ Mの本発明による抗体(O-13)または対照群抗体の存在下で24時間培養した。次いで、上述したようにして距離を決定した。

前記測定結果を図5Dに示す。前記図5Dに示すように、グレムリン-1-A549細胞はMock-A549細胞と比較して増加された移動を示し、このような増加された移動は本発明による抗体(O-13)を添加したときに大幅に抑制された。

40

【0078】

<7-5> 細胞増殖の分析

グレムリン-1が細胞成長に影響を及ぼすか否かを確認するために、細胞増殖の分析を行った。前記分析は、セルタイター96アクオス・ワン・ソリューション・セル・プロリフェレーション・アッセイ(Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay)(プロメガ社製、マディソン、ウィスコンシン州)を用いて10%FBS入りRPMI-1640培地において96ウェルプレートで行った。具体的に、Mock-A549細胞及びグレムリン-1-A54

50

9細胞を1ウェルあたりに1,000の細胞密度で塗抹した。24時間後に細胞を無血清培地で2回洗浄し、3μMの本発明による抗体(O-13)が含有するかあるいは含有していない完全培地100μLで培養した。細胞増殖を492nmのフィルターを有する96ウェルプレートに対してラブシステムズ・マルチスキャン・アセント・フォトメトリック・プレート・リーダー(Labsystems Multiskan Ascent Photometric plate reader)(サーモ・ラブシステムズ社製、フランクリン、マサチューセッツ州)を用いて決定した。実験は3回繰り返し行った。

前記測定結果を図5Eに示す。前記図5Eに示すように、グレムリン-1-A549細胞はMock-A549細胞と比較してさらに高い成長速度を示し、前記増大された成長速度は本発明による抗体(O-13)の添加によって抑制された。

10

【0079】

<7-6> 腫瘍成長の分析

腫瘍形成に対するグレムリン-1の効果を評価するために、下記のようにしてグレムリン-1-A549細胞またはMock-A549細胞をヌードマウス内に皮下注射した後、腫瘍体積を測定した。

全ての動物実験は実験動物資源ソウル大学協会及び使用委員会(Permit number: SNU-11-0207)の承認を受けた。グレムリン-1-A549細胞及びMock-A549細胞(1.0×10^6 細胞/マウス)を4~6週齢の雌無胸腺ヌードマウス(各処理群あたりに7匹)の右側わき腹に皮下注射した。腫瘍の形成及び大きさを腫瘍の長さ及び幅をノギスで測定して毎週評価した後、下記式を用いて腫瘍の体積を計算した

20

(Tomayko MM et al., (1989) Cancer Chemother Pharmacol 24: 148-154):

$$\text{腫瘍の体積} = (\text{長さ} \times \text{幅} \times \text{高さ}) / 2$$

前記測定結果を図5Fに示す。グレムリン-1-A549細胞を注射したマウスにおける腫瘍の体積は、Mock-A549細胞を注射したマウスよりも急増し、注射してから14週目に略500mm³の腫瘍サイズ差を示す。この結果は、グレムリン-1の発現増加が腫瘍の形成に重要な役割を果たすということを示す。

【0080】

実施例8: グレムリン-1抗体を用いた癌の診断

免疫組織化学染色法を用いて正常組織及び癌組織(皮膚、乳房、リンパ節、肺、肝、食道、胃、結腸、直腸、腎臓、膀胱、前立腺、睾丸、子宮頸、子宮内膜及び甲状腺癌組織)を本発明による抗体(O-13)と反応させてグレムリン-1の発現量を比較した。

30

具体的に、本発明による抗体(O-13)(2mg/ml)0.5mlをFITC試薬と混合してメーカーのガイドラインに従い抗体をFITCでラベリングした(Pierce FITC antibody labeling kit, 53027)。正常組織及び癌組織を固定させた組織配列スライド(Tissue array slide; スーパーバイオチップ社製、BC8)に対してメーカーのガイドラインに従いパラフィン除去作業を行った。前記スライドを抗原賦活液(antigen retrieval solution; TEPH9.0)入りガラスジャー(glass jar)に入れた後、プレッシャークッカー(pressure cooker)で30分間加熱した。スライドを取り出して60~65℃に冷却させ、蒸留水で洗浄し、冷たい95%エタノールに10分間浸漬した後、流水で10分間洗浄した。次いで、メーカーのガイドラインに従い、サーモ・ウルトラビジョン・LP・デテクション・システム(Thermo Ultra-vision LP detection system(サーモ社製))を用いて組織スライドに前記FITCによりラベリングされた抗体を反応させた。前記抗体は1:75で使用し、抗FITCマウスIgG(ライフスパン(LS)・バイオサイエンス社製)は1:200で使用した。次いで、HRPの結合された重合体(ラブビジョン社製)を15分間処理した後、DAB溶液を1分間処理した。マイヤ-ヘマトキシリン液(Mayer's hematoxylin solution)で反対染色した後、顕微鏡で4倍率、200倍率及び400倍率の順に観察した。前記実験を行うに当たって、IgG kappa

40

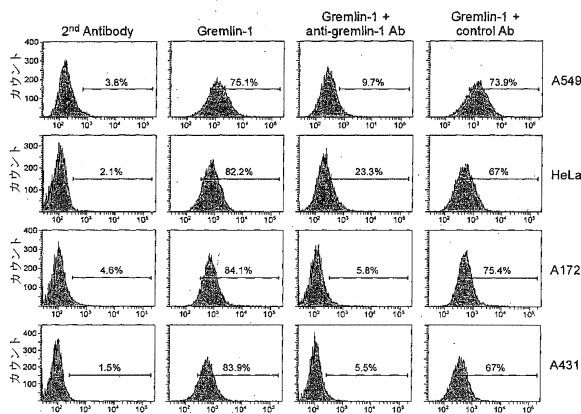
50

a 抗体を対照群として使用した。

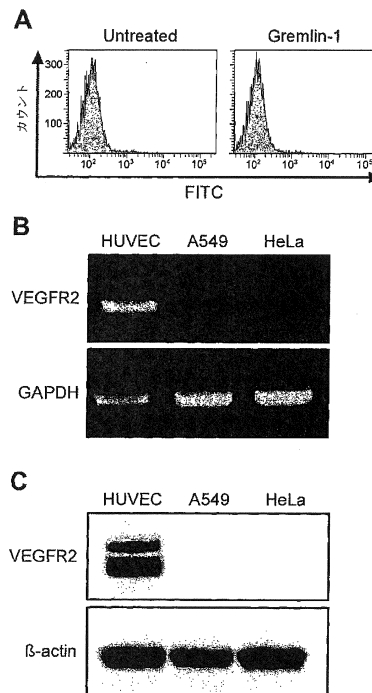
【 0 0 8 1 】

前記実験結果を図 6 A ~ 6 I に示す。前記図 6 に示すように、本発明による抗体は、正常組織と比較して皮膚、乳房、リンパ節、肺、肝、食道、胃、結腸、直腸、腎臓、膀胱、前立腺、睾丸、子宮頸、子宮内膜及び甲状腺癌組織において強い反応性を示す。これは、様々な癌組織においてグレムリン - 1 が分布されており、過発現されることを示す。したがって、本発明によるグレムリン - 1 に対する抗体を用いて癌または免疫疾患を診断することが可能になる見込みである。

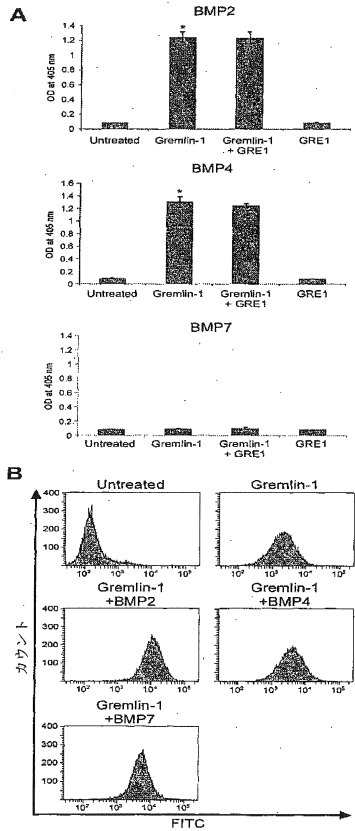
【 図 1 】



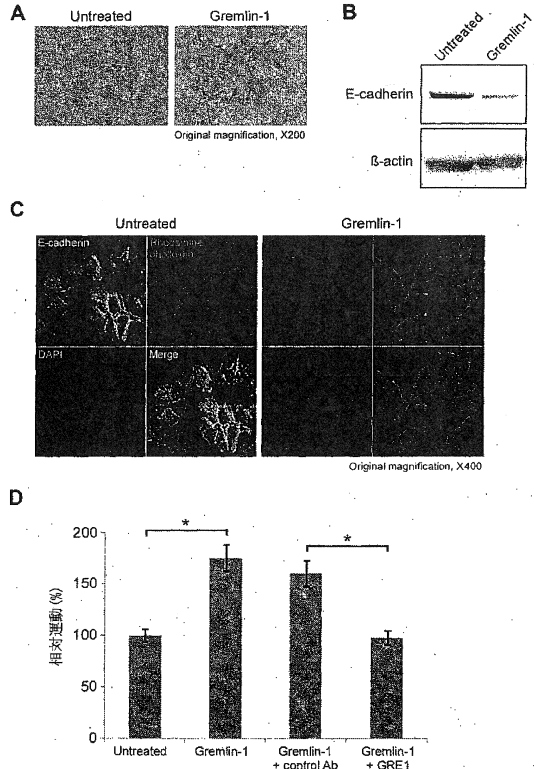
【 図 2 】



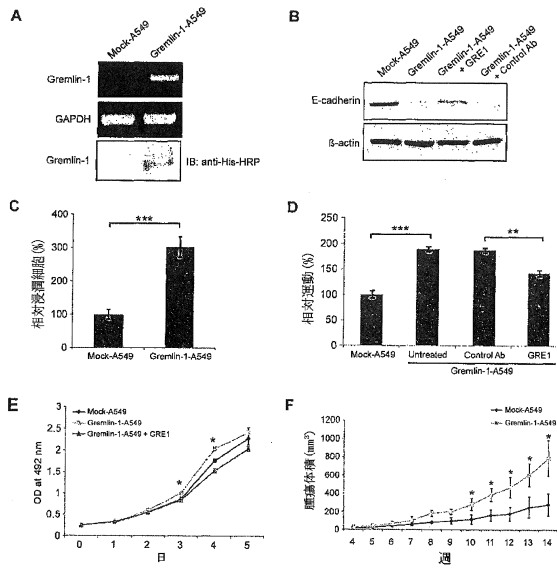
【 図 3 】



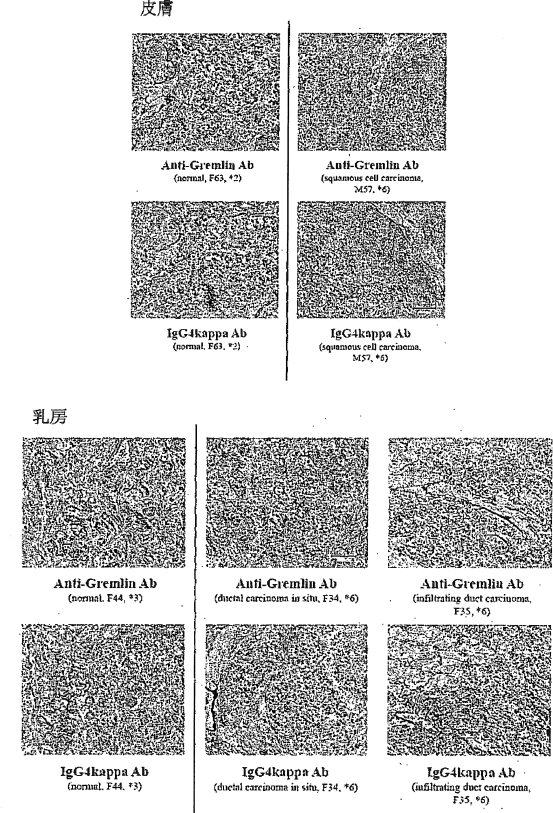
【 図 4 】



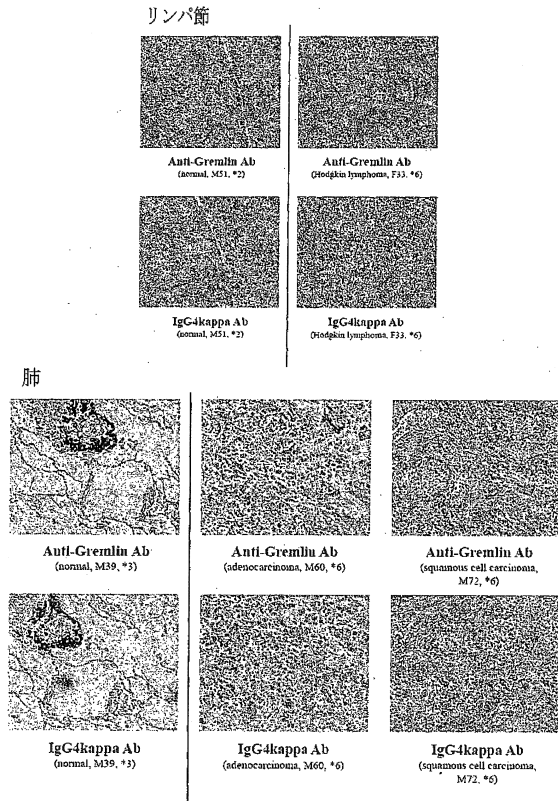
【 図 5 】



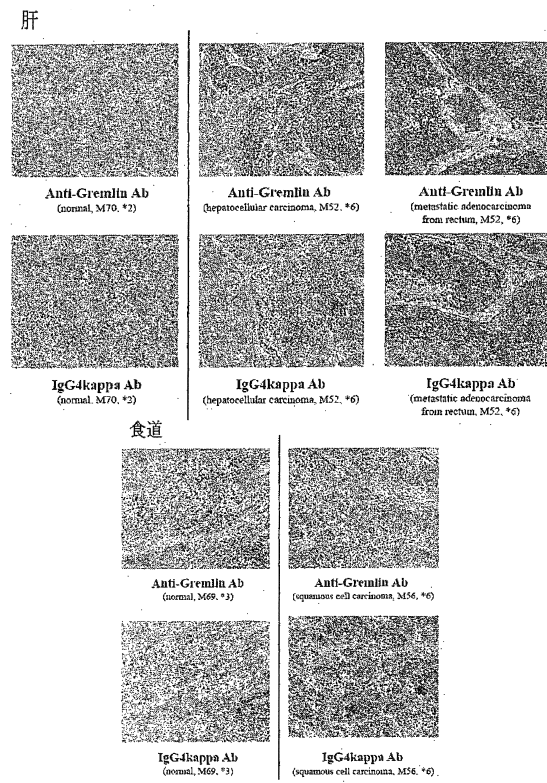
【 図 6 A 】



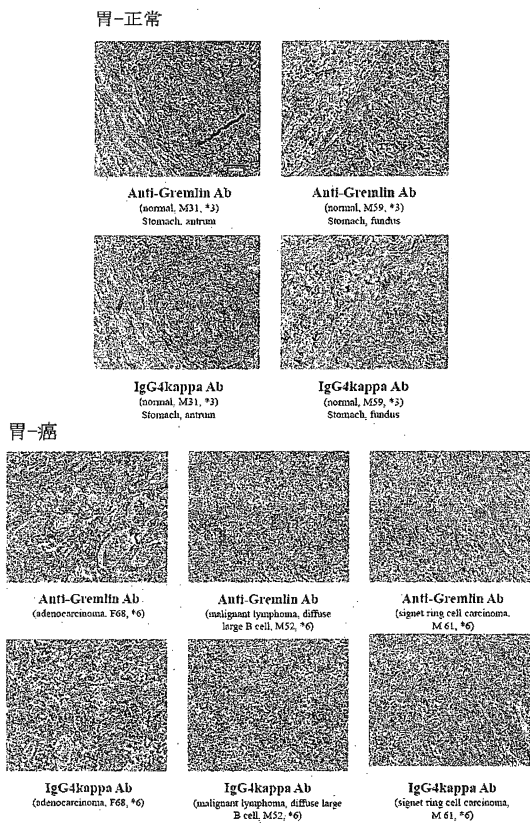
【図6B】



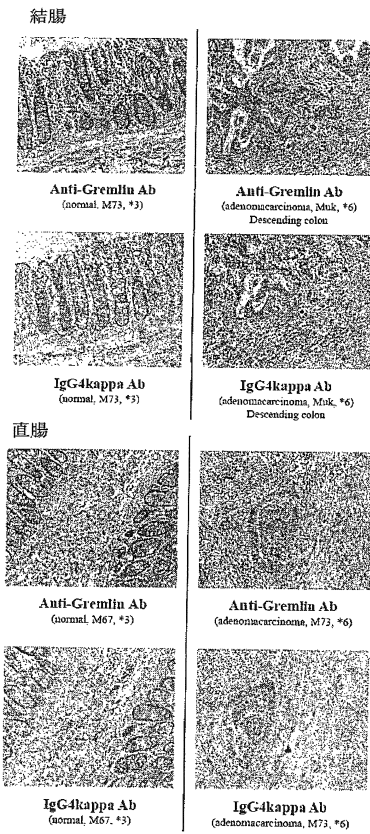
【図6C】



【図6D】

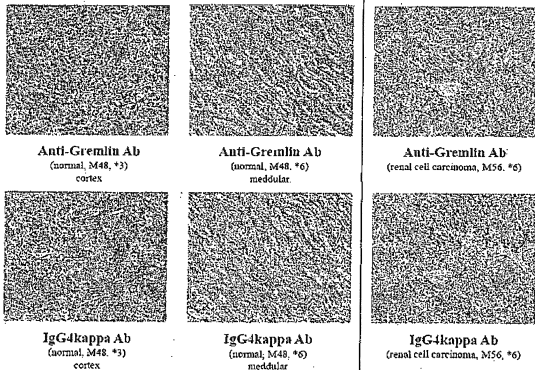


【図6E】

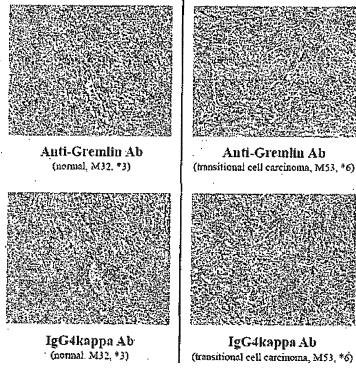


【 図 6 F 】

腎臓

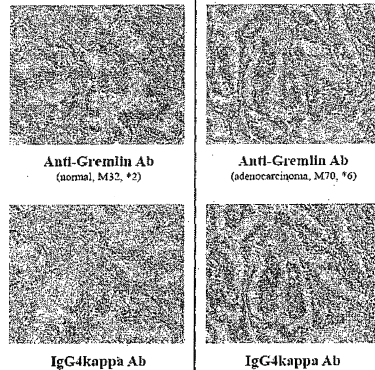


膀胱

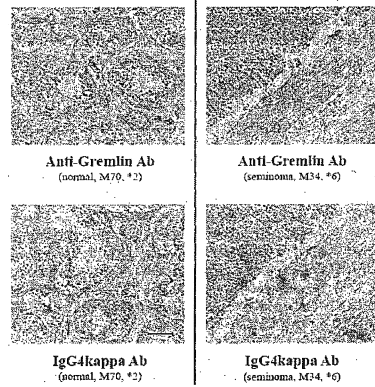


【 図 6 G 】

前立腺

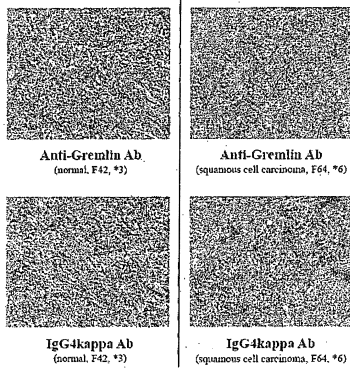


睾丸

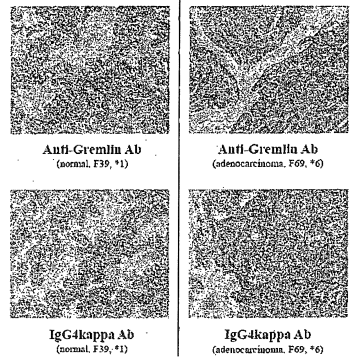


【 図 6 H 】

子宮頸

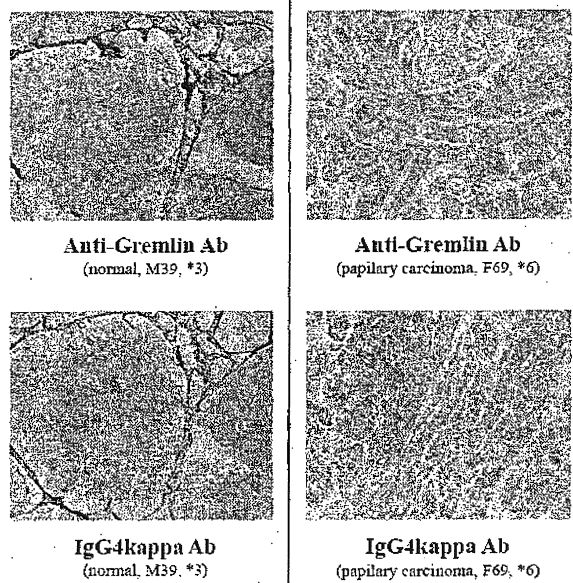


子宮内膜



【 図 6 I 】

甲状腺



【配列表】

0006339063000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	7/06
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	11/06 (2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	11/06
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	17/00
A 6 1 P	17/14 (2006.01)	A 6 1 P	17/06
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/14
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	29/00 1 0 1
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P	37/02
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	A 6 1 P	37/06
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	A 6 1 P	37/08
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	C 0 7 K	16/46 Z N A
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 A
		G 0 1 N	33/53 D
		G 0 1 N	33/574 A

- (74)代理人 100125070
弁理士 土井 京子
- (74)代理人 100136629
弁理士 鎌田 光宜
- (74)代理人 100121212
弁理士 田村 弥栄子
- (74)代理人 100174296
弁理士 當麻 博文
- (74)代理人 100137729
弁理士 赤井 厚子
- (74)代理人 100151301
弁理士 戸崎 富哉
- (72)発明者 キム、ヒョン - ケ
大韓民国、ソウル 1 3 5 - 1 1 0、ガンナム - グ、アプグジョン - ドン、ヒュンダイ・アパート
メント 1 1 8 - 8 0 4
- (72)発明者 チュン、ジュンホ
大韓民国、キョンギ - ド 4 6 3 - 8 6 2、ソナム - シ、ブンダン - グ、ソヒョン - ロ、1 7 0
、ティー - 1 8 0 1
- (72)発明者 キム、ミン ス
大韓民国、キョンギ - ド 4 8 0 - 9 1 8、ウィジョンブ - シ、ホウォン - ドン、シニル ユトヴ
イル プラス アpartment 1 0 6 - 1 7 0 3
- (72)発明者 ユン、ス ミン
大韓民国、ソウル 1 3 7 - 7 6 4、ソチョ - グ、バンポ - 2 - ドン、バンポ レミアン ファス
ティージ アpartment 1 0 0 1 - 1 0 3

合議体

審判長 福井 悟

審判官 松田 芳子

審判官 高堀 栄二

(56)参考文献 P l o S O N E , 2 0 1 2 年 4 月 1 3 日 , V o l . 7 , e 3 5 1 0 0

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/09

P u b M e d

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

S c i e n c e D i r e c t

专利名称(译)	针对gremlin-1的抗体		
公开(公告)号	JP6339063B2	公开(公告)日	2018-06-06
申请号	JP2015500366	申请日	2013-03-15
[标]申请(专利权)人(译)	首尔大学校产学协力团 金弦起		
申请(专利权)人(译)	Esuenyu伯爵 & D基金会蜂 金, 炫 - 柯		
当前申请(专利权)人(译)	Esuenyu伯爵 & D基金会蜂 金, 炫 - 柯		
[标]发明人	キムヒュンケ チュンジョンホ キムミンス ユンスミン		
发明人	キム、ヒュン-ケ チュン、ジュンホ キム、ミン ス ユン、スミン		
IPC分类号	C07K16/24 A61K39/395 A61P1/04 A61P1/16 A61P7/06 A61P9/00 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P17/14 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37 /02 A61P37/06 A61P37/08 C07K16/46 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	A61P1/04 A61P1/16 A61P7/06 A61P9/00 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P17/14 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37 /08 C07K16/22 C07K16/2863 C07K2317/24 C07K2317/70 C07K2317/73 C07K2317/76 C07K16/18 C07K2317/21 C07K2317/565 C07K2317/622		
FI分类号	C07K16/24 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P1/04 A61P1/16 A61P7/06 A61P9/00 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P17/14 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P29 /00 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K16/46.ZNA C12N15/00.A G01N33/53.D G01N33/574.A		
代理人(译)	高岛肇 当麻 博文		
优先权	61/611285 2012-03-15 US		
其他公开文献	JP2015512894A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及通过独立于成骨蛋白 (BMP) 或血管内皮生长因子受体-2 (VEGFR2) 的方法抑制gremlin-1的方法, 从而抑制gremlin-1根据本发明的抗体可用于通过抑制gremlin-1依赖性细胞迁移, 细胞侵袭和细胞增殖来治疗癌症或免疫病症 (例如癌症), 适合用作治疗剂。 点域1

(45) 発行日 平成30年6月6日 (2018. 6. 6)

(24) 登録日 平成30年5月18日 (2018. 5. 18)

(51) Int. Cl.	F I
C O 7 K 16/24 (2006. 01)	C O 7 K 16/24
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395
A 6 1 P 1/04 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 P 1/16 (2006. 01)	A 6 1 P 1/04 N
A 6 1 P 7/06 (2006. 01)	A 6 1 P 1/04
	A 6 1 P 1/16

請求項の数 9 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-500366 (P2015-500366)	(73) 特許権者	513061541
(86) (22) 出願日	平成25年3月15日 (2013. 3. 15)		エヌエヌイー アールアンドディービー ファウンデーション
(65) 公表番号	特表2015-512894 (P2015-512894A)		大韓民国 151-015 ソウル クァ ナクグ クァナクロー (シルリムド ン) 1
(43) 公表日	平成27年4月30日 (2015. 4. 30)	(73) 特許権者	507326766
(86) 国際出願番号	PCT/KR2013/002119		キム、ヒュンケ
(87) 国際公開番号	W02013/137686		大韓民国、ソウル 135-110、ガン ナムグ、アプダジョンドン、434、 ヒュンタイ・アパートメント 118-8 04
(87) 国際公開日	平成25年9月19日 (2013. 9. 19)	(74) 代理人	100080791
審査請求日	平成26年11月11日 (2014. 11. 11)		弁理士 高島 一
審判番号	不服2017-198 (P2017-198/J1)		
審判請求日	平成29年1月6日 (2017. 1. 6)		
(31) 優先権主張番号	61/611,285		
(32) 優先日	平成24年3月15日 (2012. 3. 15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グレムリン-1 に対する抗体